

**Design und Synthese neuartiger GSK-3-Inhibitoren:  
Wirkstoffe zur Protektion und Proliferationsstimulation  
pankreatischer  $\beta$ -Zellen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von  
**Hendrik Stukenbrock**  
aus Hameln

1. Referent: Professor Dr. Conrad Kunick  
2. Referent: Professor Dr. Knut Baumann  
eingereicht am: 19.12.2007  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.02.2008

Druckjahr 2008

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Mussmann, R.; Kunick, C.; Stukenbrock, H.; Geese, M.; Kegel, S.; Burk, U.: Use of azapauellones for preventing and treating pancreatic autoimmune disorders. *PCT Int. Appl.* 2006, WO2006117221.

Stukenbrock, Hendrik; Mußmann, Rainer; Geese, Marcus; Ferandin, Yoan; Lozach, Olivier; Lemcke, Thomas; Kegel, Simone; Lomow, Alexander; Burk, Ulrike; Dohrmann, Cord; Meijer, Laurent; Austen, Matthias; Kunick, Conrad: 9-Cyano-1-azapauellone (Cazpauellone), a GSK-3 Inhibitor Activating Pancreatic Beta Cell Protection and Replication. *J. Med. Chem.* 2008, im Druck

### **Tagungsbeiträge**

Stukenbrock, Hendrik. Azapauellone: GSK-3-Inhibitoren als Aktivatoren der  $\beta$ -Zellproliferation und –protektion. (Vortrag) Kolloquium der Pharmazeutischen Institute, 26.06.2007, TU Braunschweig

Stukenbrock, Hendrik; Mussmann, Rainer; Austen, Matthias; Geese, Marcus; Kegel, Simone; Lozach, Olivier; Meijer, Laurent; Kunick, Conrad.: Azapauellones: GSK-3 inhibitors activating beta cell protection and proliferation. (Poster) 234th ACS National Meeting, Boston, MA, United States, 19. - 23.08.2007

Stukenbrock, Hendrik. Azapauellone: GSK-3-Inhibitoren als Aktivatoren der  $\beta$ -Zellproliferation und –protektion. (Vortrag) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Erlangen, 11.10.2007



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2004 bis Dezember 2007 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

**Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,**

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung, die hervorragende Unterstützung, die vielen interessanten Gespräche und die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

**Herrn Professor Dr. Knut Baumann**

für die Übernahme des Koreferats.



meinen Eltern gewidmet





## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AMP	Adenosinmonophosphat
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
aliph.	aliphatisch
Äq.	Aquivalente
Arg	Arginin
arom.	aromatisch
AUC	Area under the curve
b	vorliegendes Signal erscheint verbreitert
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDCl <sub>3</sub>	Deuterochloroform
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
Ci	Cubitus interruptus
Ci	Curie
Cys	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
δ	chemische Verschiebung
Δ	Differenz
Δ T	erhitzen
d	Dublett
d <sub>6</sub> -DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DAD	Dioden Array Detektor

DCM	Dichlormethan
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. Coli	Escherichia coli
ED	Embryonic day
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EI	Elelektronenstoß-Ionisation
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
Gln	Glutamin
GS	Glycogen Synthase
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
HbA <sub>1c</sub>	Hämoglobin A <sub>1c</sub>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HMBC	Heteronuclear Multibond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
Ile	Isoleucin
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kDa	Kilo Dalton
Lit.	Literatur
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	multipllett

### III

m/z	Masse pro Ladung
mAU	milli Absorbtion Unit
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
M	molar
M <sub>r</sub>	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mM	millimolar
MW	Synthese-Mikrowellengerät
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PD	Paired domain
Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	Dipalladium(0)-tris(dibenzylidenaceton)
POD	Peroxidase
ppm	parts per million
Pro	Prolin
q	Quartett
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
sog.	so genannte
t	Triplett
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
t <sub>m</sub>	Totzeit
TMS	Tetramethylsilan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure

## IV

$t_s$	Nettoretentionszeit
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
vgl.	vergleiche
$[\gamma\text{-}^{33}\text{P}] \text{ ATP}$	Adenosintriphosphat mit $^{33}\text{P}$ -isotopmarkiertem $\gamma$ -Phosphat

<b>1.</b>	<b>Einführung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
1.1	Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) als Target bei verschiedenen Krankheitsbildern	1
1.2	GSK-3 im Bezug zu den Cyclin-abhängigen Kinasen	2
1.2.1	CDK1/Cyclin B	3
1.2.2	CDK5	5
1.2	GSK-3 im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer	6
1.3	GSK-3 im Zusammenhang mit Diabetes Mellitus	7
1.4	Zielsetzung	8
1.4.1	Design von GSK-3-Inhibitoren vom Paullon-Typ	9
1.4.2	Synthese neuer GSK-3-Inhibitoren vom Paullon-Typ	9
1.4.3	Testung der neuartigen Paullone auf biologische Aktivität	10
<b>2</b>	<b>GSK-3: Struktur, Regulation, Inhibitoren</b>	<b>11</b>
2.1	Struktur und Aktivität der GSK-3	11
2.2	Regulation	12
2.2.1	GSK-3 in der Insulin-Signalkaskade	13
2.2.2	GSK-3 im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade	15
2.2.3	GSK3 im Hedgehog-Signalkaskade	18
2.3	Inhibitoren der Glycogen Synthase Kinase-3	19
2.3.1	Flavopiridol und Hymenialdisin	19
2.3.2	Maleinimide	20
2.3.3	Thiadiazolidinone	22
2.3.4	Indirubine	23
2.3.5	AR-014418	24
2.3.6	Chiron-Inhibitoren	25
2.3.7	Paullone	27
2.3.8	Weitere GSK-3-Inhibitoren	28
<b>3.</b>	<b>Transkriptionsfaktor Pax4</b>	<b>32</b>
3.1	Aufbau, Regulation und Funktion von Pax-Proteinen	32
3.2	Stammzelltherapie des Diabetes mellitus	35
3.3	Transkriptionsfaktor Pax4 in der Pankreasentwicklung	36

<b>4.</b>	<b>Rationales Design von GSK-3-Inhibitoren</b>	<b>38</b>
4.1	Röntgenkristallstrukturen der GSK-3	38
4.2	Die ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$	40
4.3	Alsterpaullon in der ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$	42
4.4	Designüberlegungen zu neuen GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren vom Paullontyp	44
4.4.1	Molecular Modelling	44
4.4.1.1	Molekulares Docking mit FlexX	46
4.4.1.2	Docking von Azapaullonen in die Bindetasche der GSK-3 $\beta$	50
4.4.1.3	Generelle Anmerkungen zu den Ergebnissen des Dockings	52
4.4.2	Design von 1-Azapaullonen	53
4.4.3	Design von 2-Azapaullonen	55
4.4.4	Design von 12-Oxapaullonen	57
4.4.5	Design von Paullonen mit Substitution in weiteren Positionen	59
<b>5.</b>	<b>Synthese</b>	<b>62</b>
5.1	Synthese der in Position 9 substituierten 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i> ]indol-6(5 <i>H</i> )-one	63
5.1.1	Synthese des 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylesters und des 3-Amino-6-brompyridin-2-carbonsäureethylesters	63
5.1.2	Synthese des 7,8-Dihydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i> ]azepin-6,9-dions und des 2-Brom-7,8-dihydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i> ]azepin-6,9-dions	70
5.1.3	Synthese der 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i> ]indol- 6(5 <i>H</i> )-one	73
5.1.4	Einsatz alternativer Lösungsmittel in der thermischen Fischer- Indolsynthese	76
5.1.4.1	Mikrowellen-induzierte Synthese in Wasser	76
5.1.4.2	1-Azapaullone durch Synthese in NCW	78
5.2	Synthese der in Position 9 substituierten 7,12-Dihydro-pyrido[4',3':2,3]azepino[4,5- <i>b</i> ]indol-6(5 <i>H</i> )-one	80
5.2.1	Synthese des 3,4-Dihydro-pyrido[4,3- <i>b</i> ]azepin-2,5-dions	80
5.2.2	Synthese von in Position 9 substituierten 7,12-Dihydro-pyrido[4',3':2,3]azepino[4,5- <i>b</i> ]indol-6(5 <i>H</i> )-onen	83
5.3	Synthese von in Position 9 substituierten 5,7-Dihydro-6 <i>H</i> - [1]benzofuro[3,2- <i>d</i> ]benzazepin-6-onen	86

## VII

5.3.1	Synthese des 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dions und des 7-Iod-3,4-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dions	90
5.3.2	Synthese von <i>O</i> -Arylhydroxylamin-Hydrochloriden	92
5.3.3	Synthese der 12-Oxapallone	96
5.3.4	Syntheseversuche zur Darstellung von 5,7-Dihydro-6 <i>H</i> -[1]benzofuro[2,3- <i>d</i> ]pyrido[3,2- <i>b</i> ]azepin-6-on	99
5.4	Synthese von 9,11- sowie 8,10-disubstituierten 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i> ]indol-6(5 <i>H</i> )-onen	104
5.4.1	Zur Strukturaufklärung von 2l	106
5.5	Syntheseversuch von 9,12-disubstituierten 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i> ]indol-6(5 <i>H</i> )-onen	114
5.6	Synthese von in Position 12 substituierten 1- und 2-Azapallonen durch Fischer-Indolsynthese mit 1-substituierten 1-Arylhydrazinen	117
5.7	Synthesen von in Position 2 und 9 substituierten Paullonen	118
5.8	Synthesen weiterer neuer heterozyklischer Systeme	125
<b>6.</b>	<b>Biologische Aktivität und Struktur-Aktivitätsbeziehungen</b>	<b>131</b>
6.1	Proteinkinase-inhibitorische Aktivität	131
6.1.2	Generelle Anmerkungen zur Interpretation der Struktur-Aktivitätsbeziehungen	132
6.1.3	Inhibitorische Aktivität der in Position 9 substituierten 1-Azapallone	132
6.1.4	Inhibitorische Aktivität der in Position 9 substituierten 2-Azapallone	136
6.1.5	Inhibitorische Aktivität der 12-Oxapallone	137
6.1.6	Inhibitorische Aktivität der <i>N</i> -substituierten Azapallone	138
6.1.7	Inhibitorische Aktivität der 2,11- und 9,11-disubstituierten Paullone	141
6.1.8	Inhibitorische Aktivität der Furo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-5-one	142
6.2	Untersuchung zur intrazellulären GSK-3-inhibitorischen Aktivität	143
<b>7.</b>	<b>Protektion und Proliferationsinduktion von INS-1E- und pankreatischen <math>\beta</math>-Zellen durch GSK-3-Inhibitoren</b>	<b>145</b>
7.1	Zellprotektive Wirkung von 1-Azapallonen	145
7.2	Antiapoptotische Wirkung von 1-Azapallonen	148
7.3	Proliferationssteigernde Wirkung von 1-Azapallonen auf INS-1E-Zellen	150

## VIII

7.4	Proliferationssteigernde Wirkung von 1-Azapauillonon auf $\beta$ -Zellen aus isolierten Ratteninseln	151
8.	<b>Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pax4</b>	<b>154</b>
9.	<b>Zusammenfassung</b>	<b>157</b>
10.	<b>Summary</b>	<b>159</b>
11.	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>161</b>
11.1	Allgemeines	161
11.2	Synthese/Analytische Daten	164
11.3	Docking	279
11.4	Biologische Daten	281
11.4.1	Kinaseaufbereitung und –Assays	281
11.4.2	$\beta$ -Catenin-Phosphorylierung in humanen SH-SY5Y Neuroblastomazellen	284
11.4.3	INS-1E- und $\beta$ -Zellaufbereitung sowie zugehörige Assays	285
12.	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>288</b>





# 1. Einführung und Zielsetzung

Proteinkinasen sind Enzyme, die die Übertragung von Phosphatgruppen von einem Donor, wie beispielsweise ATP, auf Aminosäureseitenketten katalysieren. Nach Entschlüsselung des humanen Genoms gelang auch die Identifizierung des humanen Kinoms. Dies ist das Proteinkinase-Komplement, das für insgesamt 518 Kinasen codiert.<sup>1</sup> Diese werden substratabhängig in Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosinkinasen eingeteilt. Man unterscheidet des Weiteren in membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen und cytosolisch vorliegende Nicht-Rezeptor-assozierte Tyrosinkinasen. Die Phosphorylierung von Enzymen ist ein grundlegender Prozess in vielen physiologischen Abläufen eines Organismus. Kinasen stellen wichtige Schaltstellen im Zellzyklus dar. Sie regulieren dabei wichtige Parameter wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Bewegung und Zelltod.<sup>2</sup> Fehlregulation der Kinaseaktivität wird mit Krankheiten wie Krebs, rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Asthma, kardiovaskulären- und neurologischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Die Regulation der Kinaseaktivität mittels geeigneter Wirkstoffe ist eine mögliche Therapieoption bei den genannten Krankheiten, die sich bereits in der Krebstherapie bewährt hat.<sup>3</sup>

## 1.1 Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) als Target bei verschiedenen Krankheitsbildern

Während der letzten zwanzig Jahre wurden die Komponenten abwärts des Insulinrezeptors intensiv untersucht. Dabei wurde als wichtige Schaltstelle das Enzym Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) identifiziert.<sup>4</sup> Neben der physiologischen Bedeutung in der Insulin-Signalkaskade ist die GSK-3 in weiteren Signalübertragungswegen involviert. Dysregulierung der GSK-3 führt neben Typ-2-Diabetes mellitus<sup>5,6</sup> zu verschiedenen Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer,<sup>7,8</sup> bipolarer affektiver Störung,<sup>9</sup> Krebs<sup>10,11</sup> und zu Entzündungsprozessen.<sup>12</sup> Untersuchungen haben gezeigt, dass GSK-3-Inhibitoren die Entwicklung von embryonalen Stammzellen beeinflussen können,<sup>13,14</sup> auch ein möglicher Ansatz in

der Malaria-Therapie scheint denkbar.<sup>15,16</sup> Herauszuheben sind die viel versprechenden Ergebnisse, die in der regenerativen Medizin erzielt wurden: Die Inhibition der GSK-3 wird dort in Zusammenhang mit der Regeneration von pankreatischen  $\beta$ -Zellen gebracht.<sup>17</sup> Diese breite Einbindung in verschiedene Regulationsmechanismen macht die GSK-3 zu einem interessanten Target, allerdings stellt die Vielzahl an Funktionalitäten auch die größte Herausforderung bei der Entwicklung eines medizinisch sinnvoll einsetzbaren GSK-3-Inhibitors dar. Ziel ist es, möglichst nur in einzelne pathophysiologische Prozesse einzugreifen und andere durch GSK-3 getriggerte Regulationsmechanismen nicht oder nur wenig zu beeinflussen.<sup>18</sup>

## 1.2 GSK-3 im Bezug zu den Cyclin-abhängigen Kinasen

Bei der GSK-3 handelt es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die innerhalb der Familie der Proteinkinasen eine große phylogenetische Verwandtschaft zu den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) aufweist.<sup>19</sup> Cyclin-abhängige Kinasen sind an der Regulation des Zellzykluses beteiligt. Neben der Steuerung dieses für den Organismus lebenswichtigen Regelwerks finden sich weiterhin CDK, die Aufgaben in neuronalen Funktionen übernehmen und die direkt an der Transkription beteiligt sind.<sup>20-22</sup> Innerhalb der CDK-Familie besteht eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz, welche zu einer sehr ähnlichen räumlichen Struktur der Proteine führt.<sup>20</sup> Etwa 300 Aminosäuren bilden die katalytische Funktionseinheit der CDK, die in zwei unterschiedliche Subdomänen eingeteilt wird: Eine N-terminale Domäne, die reich an  $\beta$ -Faltblattstrukturen ist und eine C-terminale Domäne, deren Sekundärstruktur durch  $\alpha$ -Helices bestimmt wird. Verbunden werden beide Domänen durch eine kurze Sequenz an Aminosäuren, die als Hinge-Region bezeichnet wird. Der Name der CDK begründet sich aus dem Zusammenspiel mit Ihren Aktivatoren, den Cyclinen. Diese Proteine steuern konzentrationsabhängig die katalytische Aktivität der CDK. Die Anlagerung eines Cyclins an die sog. cyclin box der CDK bewirkt eine räumliche Veränderung der katalytischen Domäne. Dabei wird das aktive Zentrum aufgeweitet, ein inhibitorischer Abschnitt, der sog. T-Loop des Enzyms, wird aus der Kavität entfernt, und andere, die Phosphat-Übertragung begünstigende Reste, werden in die Bindetasche hinein orientiert. Zusätzlich wird

der entsprechende Serin bzw. Threonin-Rest der CDK einer Phosphorylierung durch CDK-aktivierende Kinasen zugänglich gemacht, was zu einer weiteren Steigerung der Aktivität des CDK/Cyclin-Komplexes führt.<sup>23</sup> Es sind 15 Cycline bekannt, die je nach Affinität unterschiedliche Kombinationen mit den 9 bekannten CDK eingehen.<sup>24</sup> Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit zu den CDK, verhält es sich mit der Aktivierung bzw. der Aktivität der GSK-3 grundlegend anders. Die GSK-3 ist in den meisten Zelltypen hochaktiv, ohne dass ein Aktivator, wie z.B. ein Cyclin für die Aktivierung erforderlich wäre. Vielmehr wird die GSK-3 durch inhibitorische Einflussnahme reguliert.<sup>25</sup>

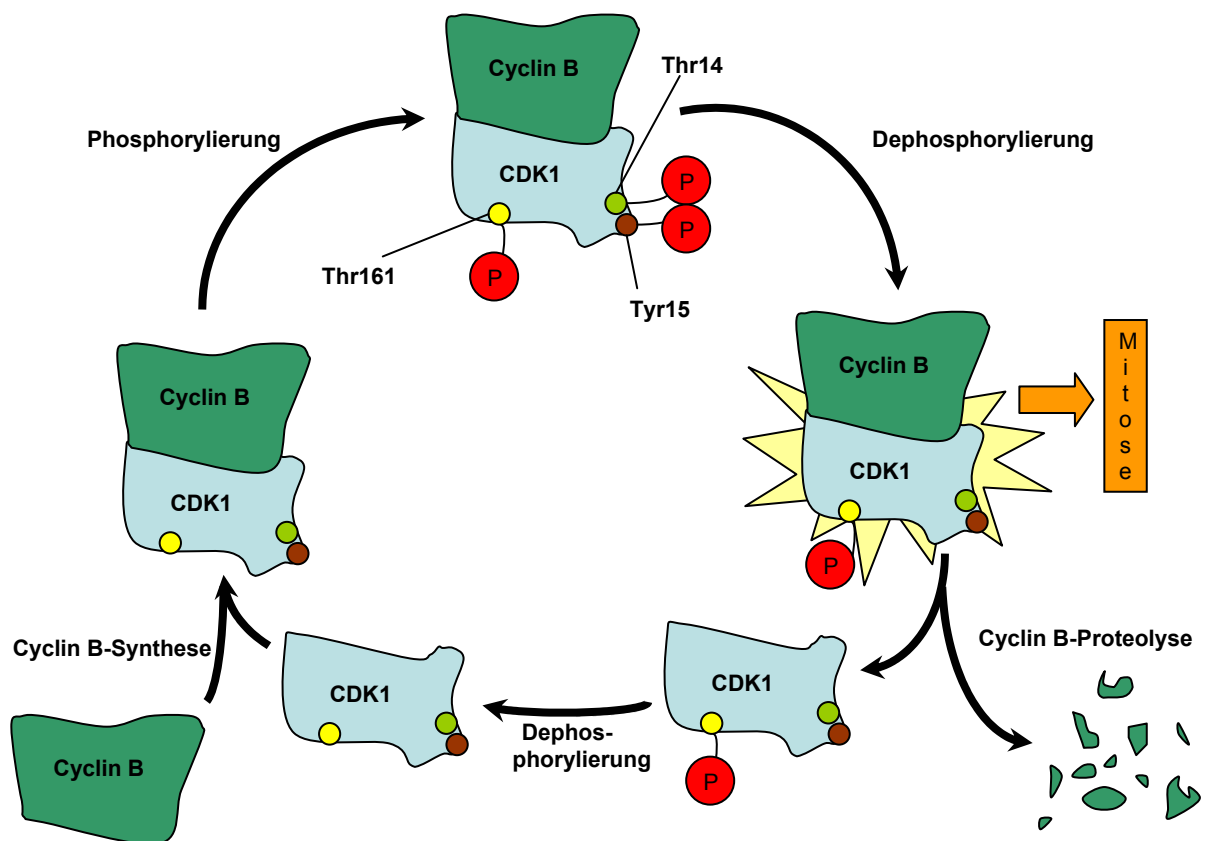
Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit ATP-kompetitive Inhibitoren beschrieben werden, die neben der Wirkung auf GSK-3 auch auf Inhibition von CDK1/Cyclin B und CDK5/p25 getestet worden sind, wird im Folgenden auf diese beiden Vertreter der CDK-Familie näher eingegangen.

### **1.2.1 CDK1/Cyclin B**

Der CDK1/Cyclin B-Komplex steuert im Zellzyklus den Übergang von der G2- in die M-Phase und wird überexprimiert in Brust-, Prostata- und Colorektalkarzinomen vorgefunden.<sup>26</sup> Folglich stellt die Inhibition dieses Komplexes eine mögliche Therapieoption bei den angeführten Krebsarten dar.<sup>27</sup> In Säugerzellen beginnt die Synthese von Cyclin B in der S-Phase. Es kommt zur Akkumulation des Cyclins und der Komplex mit CDK1 wird ausgebildet. Zu diesem Zeitpunkt ist der Komplex inaktiv, was auf die Phosphorylierung der Positionen Tyr15 und Thr14 durch die Kinasen Wee1 und Myt1 zurückzuführen ist.<sup>28</sup> Weiterhin liegt das im T-Loop lokalisierte Thr161 phosphoryliert vor. Dies trägt später zur entscheidenden Aktivitätssteigerung des Enzym-Komplexes bei.<sup>29</sup> Beim Übergang in die M-Phase wird der Komplex in den Zellkern transportiert und dort durch Phosphat-Abspaltung an Tyr15 und Thr14 durch die Phosphatasen cdc25B und cdc25C aktiviert. Die Phosphorylierung der für die M-Phase wichtigen Substrate wird von dem jetzt aktiven CDK1/Cyclin B-Komplex vorgenommen, der als „Mitosis Promoting Factor“ (MPF) bezeichnet wird.<sup>30</sup> Inaktivierung des MPF erfolgt durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse des Cyclin B, was die Rückkehr der Zelle aus der M-Phase in die G1-Phase zur Folge hat.<sup>31</sup> Im weiteren Verlauf des Zellzyklus kommt es

wiederum zum Anstieg der Cyclin B-Konzentration, und der Prozess beginnt erneut (Abbildung 1.1). Bis dato (Stand Dezember 2007) ist es nicht gelungen, eine Röntgenkristallstruktur der CDK1 zu erzeugen, so dass man bei Designüberlegungen eines möglichen Inhibitors auf Homologie-Modelle des Enzyms zurückgreifen muss. Ausgehend von einer Röntgenkristallstruktur des CDK2/Cyclin A-Komplexes ist ein Homologie-Modell des CDK1/Cyclin B-Komplexes generiert worden, welches Einblick in die ATP-Bindungsregion erlaubt.<sup>32</sup> Diese Information lässt sich für die Optimierung von Inhibitoren nutzen, was am Beispiel der Paullone gezeigt wurde.<sup>33</sup>

Abbildung 1.1: MPF-Aktivierung (modifiziert nach Cooper)<sup>30</sup>



### 1.2.2 CDK5

Bei der CDK5 handelt es ebenfalls um eine Serin/Threonin-Kinase. Trotz einer hohen Homologie zu anderen CDK bildet diese Kinase eine Ausnahme, da sie nicht durch Cycline aktiviert wird.<sup>34</sup> Vielmehr handelt es sich bei den Aktivatoren der CDK5 um die homologen Proteine p35 und p39, die keine Sequenzähnlichkeit zu den Cyclinen aufweisen. Durch eine von der Serin-Protease Calpain induzierte Proteolyse der Proteine p35 und p39 kommt es zur Ausbildung der Fragmente p25 und p29. Sind diese Spaltprodukte an die CDK gebunden, erfährt der CDK5/p25 bzw. p29-Komplex eine weitere Aktivitätssteigerung.<sup>35</sup> Daneben gibt es weitere Unterschiede in der Regulierung der CDK5. Phosphorylierung an Thr14 und Tyr15 führt bei anderen CDK zu einer schwächeren Aktivität (vgl. Abschnitt 1.2.1). Diese Beobachtung gilt nicht für die CDK5. Höchste Aktivität liegt bei anderen CDK erst nach Phosphorylierung des T-Loops vor. Trotz der Präsenz des phosphorylierbaren Ser159, dem Positionsäquivalent des Thr161 in der CDK1, liegt diese Aminosäure in vitro unphosphoryliert vor.<sup>28</sup> Die höhere Aktivität des CDK5/p25-Komplexes im Vergleich zum CDK5/p35-Komplex kann pathophysiologische Auswirkungen haben. Neben der kürzeren Halbwertszeit des p35, verglichen mit der des p25, ist auch die Lokalisierung dieser Proteine wesentlich für die Schäden, die durch eine unkontrollierte Steigerung der Enzymaktivität hervorgerufen werden können. Im Gegensatz zu p35 ist das Fragment p25 nicht mehr räumlich an die Membran gebunden und konzentriert sich im Zellkörper und Nucleus der Neuronen.<sup>36</sup> Hochregulation der CDK5 durch die Fragmente p25 und p29 verstärkt die Phosphorylierung von cytosolischen und cytoskeletalen Proteinen, was zu Neurodegeneration führen kann.<sup>37</sup> Eine erhöhte CDK5-Aktivität wird mit Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer,<sup>38</sup> amyotropher Lateralsklerose<sup>39</sup> und Morbus Parkinson<sup>40</sup> in Verbindung gebracht. Des Weiteren führt die Inhibition der CDK5 zu einer verstärkten Insulinsekretion in Gegenwart von hohen Glucosekonzentrationen.<sup>41,42</sup> Durch Röntgenkristallstrukturen, in denen die Inhibitoren (*R*)-Roscovitin, Aloisin-A und Indirubin-3'-oxim kokristallisiert mit dem CDK5/p25-Komplex vorliegen, lassen sich wichtige Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen ableiten, die von Nutzen beim Design neuartiger Inhibitoren sein können.<sup>37</sup> Die große Ähnlichkeit der CDK1- und der CDK5-ATP-Bindetasche stellt eine Herausforderung bei der Entwicklung selektiver Inhibitoren für die beiden Kinasen dar. Nur drei Aminosäuren der ATP-Bindetasche variieren von CDK1 zu

CDK5 (Leu83-Cys83; Thr84-Asp84; Met85-Glu85). Alle drei Aminosäuren sind in einer Weise orientiert, dass der Backbone zur ATP-Bindungsregion zeigt, die Seitenketten sind von der Bindetasche weg gerichtet. Vergleich der durch CoMSIA erzeugten Konturdiagramme, belegt neben gleichen Wasserstoffbrückenbindungs-Möglichkeiten fast identische elektrostatische und sterische Eigenschaften der beiden ATP-Bindungstaschen. Es sind lediglich geringe Unterschiede in der relativen Größe auszumachen.<sup>43</sup> Der Mangel an charakteristischen Unterschieden in den beiden ATP-Bindetaschen erschweren das Design von selektiven CDK1- bzw. CDK5-Inhibitoren.

## 1.2 GSK-3 im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer

GSK-3 ist mit verschiedenen neuropathologischen Mechanismen assoziiert, die in Morbus Alzheimer involviert sind. Die postmortale Diagnose des Morbus Alzheimer beruht auf der Präsenz von zwei abnormalen Einlagerungen im Gehirn: zum einen die extrazellulären Plaques aus Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ) und zum anderen die intrazellulären Neurofibrillenbündel (NFTs), die aus dem Protein Tau bestehen. Untersuchungen an Gehirnen von Alzheimerpatienten zeigten erhöhte GSK-3-Werte im Vergleich zu Gehirnen von Patienten gleichen Alters, die nicht an Morbus Alzheimer erkrankt waren.<sup>44</sup> Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte GSK-3 $\beta$ -Expression mit Progression der NFT-Bildung sowie Neurodegeneration lokal und zeitlich zusammenfallen.<sup>45</sup> Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die aktive Form der GSK-3 $\beta$  in erhöhtem Maß in von Alzheimer betroffenen Gehirnen vorliegt. Erste Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Einsatz von geeigneten GSK-3-Inhibitoren liegen vor: GSK-3-Inhibition führte zu einer Abnahme der  $A\beta$ -Produktion in Zellen und in einem Amyloidosis-Tiermodell, wobei der exakte Mechanismus unklar bleibt.<sup>8</sup> Beobachtungen, dass C-terminale Fragmente des Amyloid Precursor Proteins (APP) unter Einwirkung von GSK-3-Inhibitoren akkumulieren, sprechen für eine Beeinflussung der  $\gamma$ -Secretase-Aktivität durch die GSK-3. Die  $\gamma$ -Secretase-Aktivität beruht auf einem Multiproteinkomplex, der für die terminale Spaltung des APPs notwendig ist, was zur Bildung von  $A\beta$  führt. Untersuchungen an APP-transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die Inhibition der GSK-3 zu

neuroprotektiven Effekten führt was die Relevanz von GSK-3-Inhibitoren bei der Therapie des Morbus Alzheimers unterstreicht.<sup>46</sup>

### **1.3 GSK-3 im Zusammenhang mit Diabetes Mellitus**

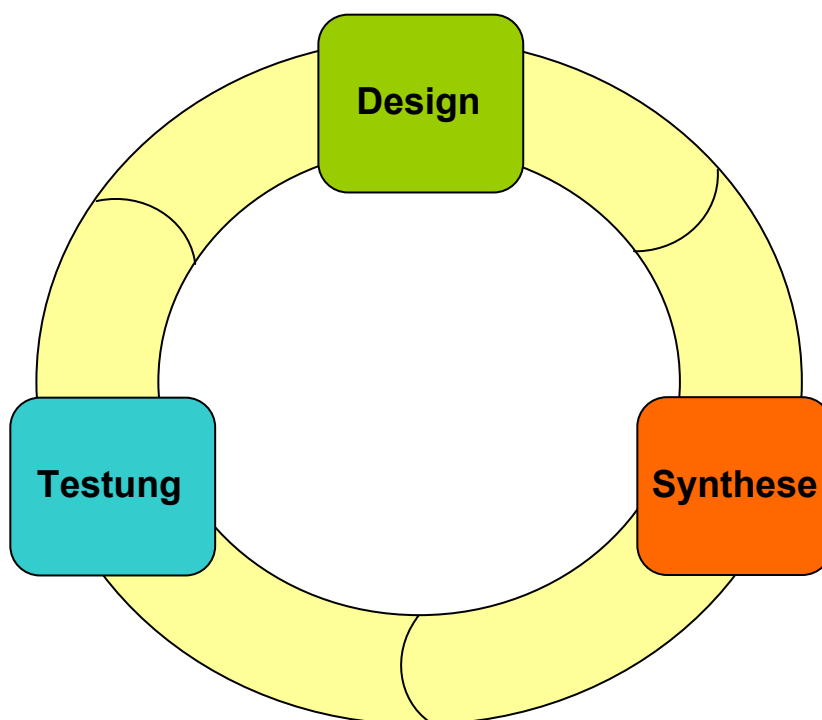
Diabetes mellitus ist zu einem schwerwiegenden Gesundheitsproblem geworden. Ursächlich in der Fehlregulation des Blutglucosespiegels begründet, führen vor allem die Folgeerkrankungen einer diabetischen Stoffwechsellage, wie beispielsweise Mikro- und Makroangiopathien, zu schweren gesundheitlichen Komplikationen. Eine ansteigende Prävalenz ist gerade in den westlichen Industrienationen zu beobachten, und trotz verbesserter Behandlungsmethoden verlangt es nach neuen Therapieoptionen.<sup>47</sup> Die Einflussnahme auf die Aktivität der GSK-3 wäre ein möglicher Ansatz, da sie zu der Regelung des Blutglucosespiegels beiträgt und an weiteren Prozessen beteiligt ist, die mit Diabetes mellitus assoziiert werden.<sup>48</sup> In verschiedenen Geweben kommt es während diabetischer Stoffwechsellagen zur Hyperaktivität der GSK-3. In Skelettmuskulatur-Biopsien von Typ 2-Diabetikern werden im Vergleich zu Kontrollen verdoppelte GSK-3-Aktivitäten gefunden.<sup>49</sup> GSK-3-Inhibitoren sind in der Lage, den Plasma-Glucosespiegel konzentrationsabhängig um bis zu 50% zu senken.<sup>50</sup> GSK-3 kann als pro-inflammatorisches Enzym wirken, indem sie die Produktion des Zytokins IL-6 steigert, welches Insulinresistenz in Leber und Fettgewebe hervorrufen kann.<sup>51</sup> Neben den genannten Wirkmechanismen beim möglichen Einsatz von GSK-3-Inhibitoren in der Therapie des Diabetes mellitus eröffnen die Ergebnisse aus der Erforschung der  $\beta$ -Zellregeneration ein weiteres Anwendungsgebiet: Die Inhibition der GSK-3 steigert die Replikation von  $\beta$ -Zellen des Pankreas und wirkt protektiv gegenüber apoptotischen Einflüssen.<sup>17</sup> Dieser neuartige, viel versprechende Ansatz könnte die Lebensqualität von Diabetikern entscheidend verbessern. Gerade im Hinblick auf Patienten, deren  $\beta$ -Zellen durch Autoimmunreaktionen zerstört werden (Typ 1 Diabetes mellitus und LADA (latent autoimmune diabetes in adults)), ist die weitere Erforschung dieser innovativen Therapiemöglichkeit wünschenswert.<sup>52</sup>  $\beta$ -Zellprotektion, die beim Einsatz des IL-1-Rezeptor-Antagonisten Anakinra bei Typ 2 Diabetes mellitus in einer klinischen Studie beobachtet wurde, stützt diesen therapeutischen Ansatz.<sup>53,54</sup>



## 1.4 Zielsetzung

Publizierte Röntgenstrukturanalysedaten von GSK-3-Inhibitorkomplexen erleichtern das rationale Design neuer Hemmstoffe. Ziel der vorliegenden Arbeit war, ausgehend von diesen Erkenntnissen potente und selektive GSK-3-Inhibitoren auf der Grundlage der Struktur von Paullonen zu entwickeln. Diese Vorgehensweise findet Ausdruck in dem folgenden Entwicklungszyklus, den die in dieser Arbeit vorliegenden Endverbindungen durchlaufen haben (Abbildung 1.2).

Abbildung 1.2: Entwicklungszyklus der neuartigen Paullone



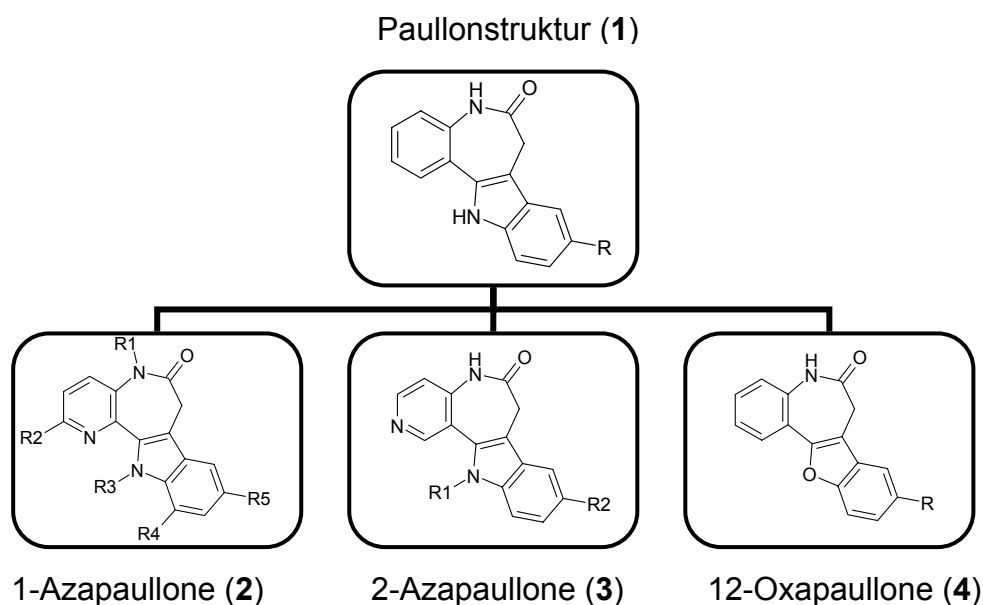
### 1.4.1 Design von GSK-3-Inhibitoren vom Paullon-Typ

Alsterpaullon<sup>55</sup> ist ein potenter, selektiver GSK-3-Inhibitor, von dem ein Kokristallinat mit der GSK-3 $\beta$  vorliegt, welches mittels Röntgenstrukturanalytik untersucht wurde.<sup>56</sup> Die Struktur dieses Kokristallinats wurde auf Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zwischen Alsterpaullon und der ATP-Bindetasche hin analysiert und es wurden Verbindungen entworfen, von denen man sich eine ähnliche Orientierung in der Bindungstasche versprach. Ziel des Designs der neuen Verbindungen sollte eine optimale Anpassung der Inhibitoren an die Gegebenheiten der Bindetasche sein, um möglichst selektive Inhibitoren zu erhalten. Veränderungen bestimmter Teilstrukturen des heterozyklischen Grundgerüsts<sup>57</sup> und Modifikation der Substituenten in Art und Position schienen geeignete Strategien, um neue selektive, potente Paullone zu entwerfen. Zusätzliche Informationen über die Bindungsmodi der potenziellen Inhibitoren sollten durch Docking in die ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$  erhalten werden und direkt in die Designüberlegungen mit einfließen.

### 1.4.2 Synthese neuer GSK-3-Inhibitoren vom Paullon-Typ

Auf Grundlage der vorangegangenen Designüberlegungen wurden Paullone synthetisiert, die folgende Modifikationen im Vergleich zum ursprünglichen Paullongrundgerüst aufweisen (Abbildung 1.3):

Abbildung 1.3: Strukturen der neuartigen Paullone



### 1.4.3 Testung der neuartigen Paullone auf biologische Aktivität

Nach Synthese der vorliegenden Verbindungen wurden diese in verschiedenen Testsystemen auf biologische Aktivität untersucht. Neben Testung auf die Inhibition von CDK5/p25, CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A, Dyrk1a und GSK-3 wurden einige Verbindungen auf deren protektive und regenerative Wirkung auf  $\beta$ -Zellen des Pankreas hin untersucht. In diesem Zusammenhang wurde noch überprüft, inwieweit die neuartigen Paullone die Expression des pankreatischen Transkriptionsfaktors Pax4 aktivieren.<sup>58</sup> Die Testergebnisse wiederum hatten unmittelbaren Einfluss auf das erneute Design von potenziellen GSK-3-Inhibitoren.

## 2 GSK-3: Struktur, Regulation, Inhibitoren

### 2.1 Struktur und Aktivität der GSK-3

Die GSK-3 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in Säugerzellen ubiquitär vorzufinden ist. Es existieren zwei Isoformen, die GSK-3 $\alpha$  und die GSK-3 $\beta$ , von der eine zweite um 13 Aminosäuren erweiterte Splice-Variante gefunden wurde.<sup>59</sup> GSK-3 $\beta$  ist mit 47 kDa leichter als die 51 kDa schwere  $\alpha$ -Isoform, was auf den Anhang eines glycinreichen Rests am N-Terminus zurückzuführen ist. Innerhalb der Kinase-Domäne besteht eine hohe Homologie zwischen den beiden Isoformen (98 % Sequenzidentität), jedoch bestehen Unterschiede in der Funktion. Entfernung der  $\beta$ -Isoform in Mäusen verursacht schwere Leberschäden durch Hepatozyten-Apoptose und führt zum Absterben des Embryos am embryonic day (ED) 16. Dies kann nicht durch die  $\alpha$ -Isoform kompensiert werden, womit evident wird, dass das degenerative Geschehen spezifisch dem Verlust der  $\beta$ -Isoform zugeschrieben werden muss.<sup>60</sup>

Strukturelle Ähnlichkeit besteht mit verschiedenen Kinasen, z.B. CDK2, p38 $\gamma$  und der MAP-Kinase ERK2, deren Phosphorylierung des Threoninrests im T-Loop-Segment erst die volle katalytische Aktivität ermöglicht. Bei den letztgenannten Kinasen ist noch eine zusätzliche Tyrosin-Phosphorylierung im T-Loop erforderlich, um den Zugang zum aktiven Zentrum aufzuweiten. Visuelle Überlagerung der Substratbindungssegmente der zweifach phosphorylierten, voll aktiven ERK2 und der unphosphorylierten, aktiven GSK-3 zeigen nahezu gleiche Konformation. Das Substrat hat in beiden Fällen Zutritt zum aktiven Zentrum, ohne dass eine sterische Hinderung zu beobachten wäre. Die Grundaktivität der unphosphorylierten GSK-3 wird durch die Phosphorylierung des T-Loops an Tyr216 der  $\beta$ -Isoform, respektive an Tyr279 der  $\alpha$ -Isoform, nochmals um das Zweifache gesteigert. Im Gegensatz dazu kommt es bei MAP-Kinasen durch Phosphorylierung des T-Loops zu einer Verstärkung der Kinaseaktivität um drei Größenordnungen.<sup>61</sup>

Ungewöhnlich ist die Präferenz der GSK-3 für präphosphorylierte Substrate. Die Casein Kinase II (CK2) phosphoryliert die Glycogen Synthase (GS) initial an einer bestimmten Position. Anschließend kommt es zur weiteren Phosphorylierung durch die GSK-3,<sup>62</sup> die durch ein bestimmtes Aminosäuremuster im Substrat dirigiert wird. Diese Erkennungssequenz besteht aus Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr-P, wobei am ersten Serin, bzw. Threonin die Phosphatübertragung durch die GSK-3 stattfindet. Daran

anschließend finden sich weitere, durch X gekennzeichnete Aminosäuren, wobei es sich häufig um Prolin handelt. Die Sequenz endet mit dem präphosphorylierten Serin bzw. Threonin. Neben der GS sind weitere Substrate der GSK-3 identifiziert worden, bei denen die Präphosphorylierung die weitere, durch GSK-3 bewirkte Phosphorylierung, um das 100 – 1000fache steigert. Es wird angenommen, dass der durch die Pre-Phosphorylierung übertragene Phosphatrest die Funktion des „fehlenden“ Phosphothreonin des T-Loops der GSK-3 einnimmt. Durch Wechselwirkung des Phosphats mit der Oxyanion-Bindetasche (Arg96, Arg180, Lys205) der GSK-3 $\beta$  wird das Substrat optimal in der Substratbindetasche positioniert und so der weiteren Phosphorylierung zugänglich gemacht.<sup>19,25</sup>

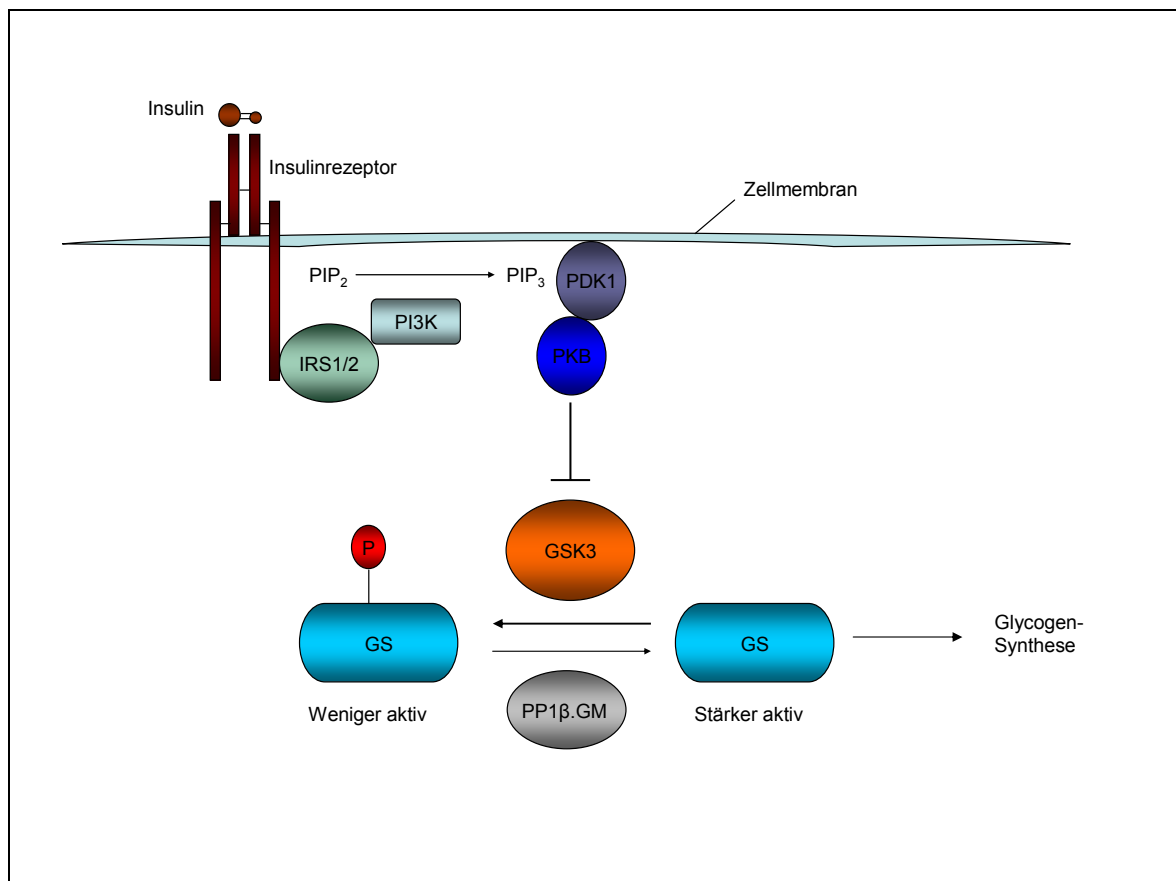
## 2.2 Regulation

Bei der GSK-3 handelt es sich um ein im Grundzustand aktives Enzym, dessen Regulation durch Inhibition erfolgt. Durch Phosphorylierung eines Serins in der N-terminalen Region (Ser21 in GSK-3 $\alpha$  bzw. Ser9 in GSK-3 $\beta$ ) kommt es zur Autoinhibition des Enzyms. Dabei lagert sich das entsprechende Phosphoserin intramolekular in die Oxyanion-Bindetasche ein, der N-terminale Abschnitt okkupiert die Substratbindetasche und blockiert sie somit für ein potenzielles Substrat.<sup>61</sup> Diese inhibitorische Phosphorylierung kann von verschiedenen Kinasen vorgenommen werden, die am Ende von vielfältigen Signalkaskaden stehen. Relevante Kinasen sind in diesem Zusammenhang MAP-Kinasen, die durch die Wachstumsfaktoren EGF und PDGF stimulierte MAPKAP-K1 und verschiedene Aktivatoren der PKA, PKC und der p70S6K.<sup>25</sup> Die Inhibition der GSK-3 führt zur Steigerung der Glycogensynthese und durch Dephosphorylierung des eukaryontischen Proteinsynthese-Initiations-Faktors-2B (eIF-2B) zu vermehrter Proteinbiosynthese.<sup>63</sup> Die weitere Einbindung der GSK-3 in die verschiedenen Signalketten soll im Folgenden diskutiert werden.

### 2.2.1 GSK-3 in der Insulin-Signalkaskade

Bei der Bindung des Insulins an seinen membranständigen Rezeptor entwickelt sich eine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität, welche zur Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrates 1 und 2 (IRS 1/2) führt. Diese aktivieren die katalytische Untereinheit p110 der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K), die ihrerseits Phosphatidyl-Inositol-3,4-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat ( $\text{PIP}_3$ ) umwandelt. Letzteres bindet an die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK-1) und an Proteinkinase B (PKB bzw. Akt) und bewirkt die Lokalisation der Enzyme an der Zellmembran, wo PDK-1 schließlich PKB aktiviert. Die GSK-3 wird nun am Serin 9 bzw. 21 durch die PKB phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Dephosphorylierung durch die Glycogen-assoziierte Form der Proteinphosphatase 1 ( $\text{PP1}\beta\text{-GM}$ ) steigert die Aktivität der GS (Abbildung 2.1).<sup>6</sup>

Abbildung 2.1: Insulin-Signalkaskade (modifiziert nach Cohen und Goedert<sup>6</sup>)



Der aufgezeigte Weg der Signaltransduktion des Insulins führt zu einer gesteigerten Glycogensynthese, woraufhin die Blutglucosekonzentration sinkt. Einen engen Zusammenhang zwischen GSK-3 und Diabetes mellitus beweist das Auftreten von doppelt so hohen GSK-3-Aktivitäten in Fett-, Leber- und Muskelgewebe von Mäusen mit diabetischer Stoffwechsellage im Vergleich zu der nicht-diabetischen Kontrollgruppe.<sup>64</sup> Die Inhibition der GSK-3 durch geeignete Inhibitoren könnte bei ausbleibender Insulininduktion, wie bei Typ1- oder fortgeschrittenem Typ 2-Diabetes mellitus mit Insulinresistenz, zur Normalisierung des Blutglucosespiegels beitragen. Untersuchungen mit knock-in-Mäusen, bei denen Serin 9 bzw. 21 durch nicht-phosphorylierbares Alanin ersetzt wurde und somit keine Insulin-vermittelte Inhibition der GSK-3 erfolgen kann, legen diese Vermutung nahe. Nach Applikation von Insulin kam es zu keiner Steigerung der GS-Aktivität. Jedoch zeigte die Glycogensynthese nach Behandlung der knock-in-Mäuse mit dem selektiven GSK-3 $\alpha/\beta$ -Inhibitor AR-A014418<sup>65</sup> eine um das fünffache gesteigerte Aktivität.<sup>66</sup> Inkubation der insulinresistenten Skelettmuskulatur von ZDF-Ratten (Ratten mit defektem Leptin-Rezeptor) mit dem GSK-3-Inhibitor CHIR98014 zeigten eine deutliche Erhöhung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme im Vergleich zu nicht-inkubierter, insulinresistenter Skelettmuskulatur.<sup>50</sup> Anwendung des selben Testsystems auf insulinsensitive Skelettmuskulatur zeigte keine gesteigerte Glucoseaufnahme,<sup>50,67</sup> was darauf schließen lässt, dass die verwendeten GSK-3-Inhibitoren wie Insulinsensitizer wirken.<sup>68</sup> Erklären lässt sich dies anhand der verschiedenen Phosphorylierungsmöglichkeiten am IRS-1: Die insulinvermittelte Tyrosin-Phosphorylierung führt an IRS-1 über die o. g. Signalkaskade zur Inhibition von GSK-3 (Abbildung 2), weitere durch Insulin ausgelöste physiologische Prozesse laufen ab. IRS-1 ist des Weiteren ein Substrat der GSK-3, wird von ihr an Serin phosphoryliert und steht der Tyrosin-Phosphorylierung durch den IR dann nicht mehr zur Verfügung. Serin-Phosphorylierung von IRS-1 wirkt hemmend in der Insulinsignaltransduktion, was zur Insulinresistenz beitragen kann. Hemmung der GSK-3 führt in diesem Zusammenhang zu einer verringerten Serin-Phosphorylierung. Daraus resultierend kann Insulin über die Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-1 wirken, das ehemals insulinresistente Gewebe wird für Insulin sensibilisiert.<sup>19,67</sup>

Insulin bewirkt die Glucoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen durch Translokation des Glucosetransporters GLUT4 vom Zellinneren zur Membran. In diesen Prozess

scheint die PKB involviert zu sein, indem sie das Substrat AS160 phosphoryliert und damit hemmt. Die aktive unphosphorylierte Form des AS160 wirkt inhibierend auf die Translokation des GLUT4 hin zur Plasmamembran. Die Phosphorylierung von AS160 ist notwendige Bedingung, um die Translokation einzuleiten.<sup>69</sup> Bei Typ 2-Diabetikern ist die Phosphorylierung gestört, was auf eine defekte PKB-Signaltransduktion zurückzuführen ist.<sup>70</sup>

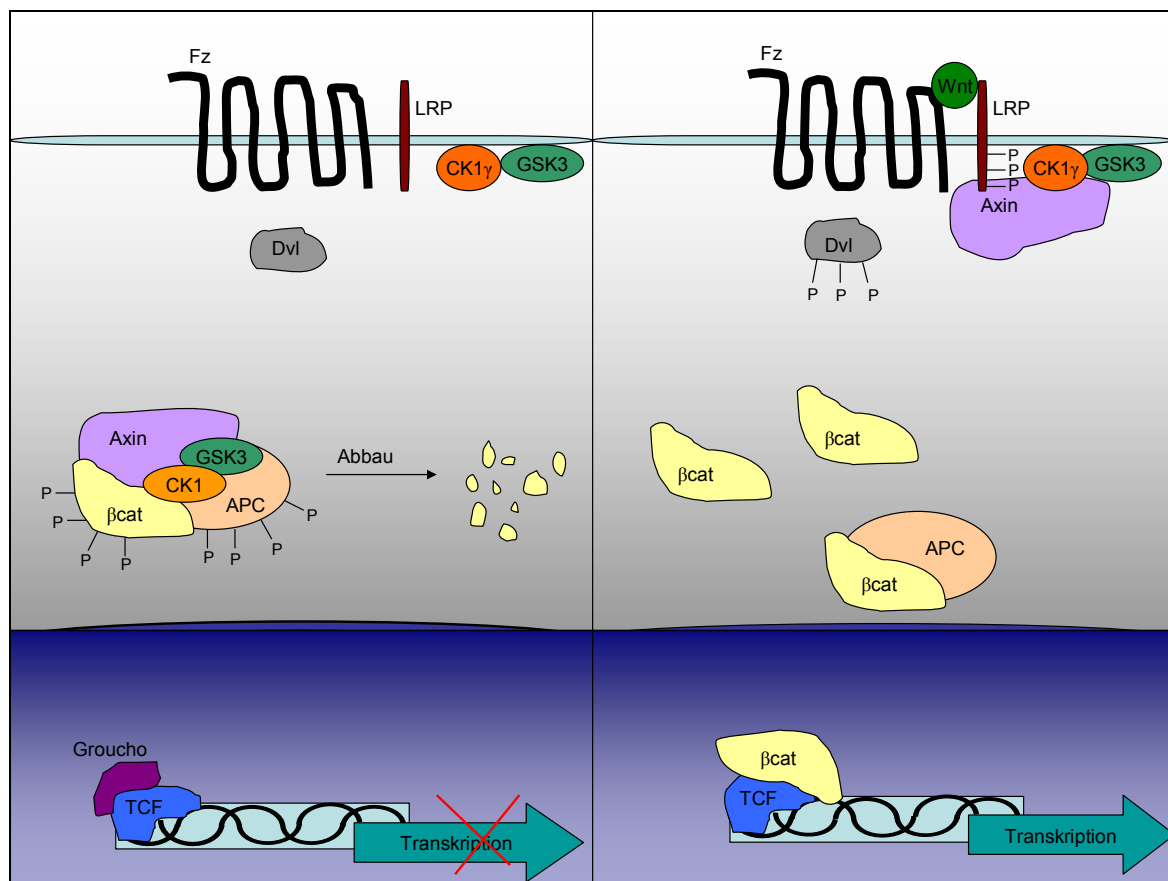
### 2.2.2 GSK-3 in der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade

Die Wnts sind eine Familie von cysteinreichen, glycosylierten Proteinliganden, die Wachstum, Differenzierung, Wanderung und Entwicklung von Zellen beeinflussen.<sup>71</sup> In vielen verschiedenen Organismen ist diese Proteinfamilie identifiziert worden, mindestens 19 Subtypen existieren in Säugern.<sup>72</sup> Eine von Wnt-Proteinen gesteuerte Signalkaskade ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway, dessen Signalübertragung zur Aktivierung von Genen führt, die durch den Transkriptionsfaktor T-cell-factor (TCF)/lymphocyte enhancer factor (LEF) reguliert werden. Auch in der Regulation dieser Signalkaskade kommt der GSK-3 eine Schlüsselrolle zu. In unstimulierten Zellen phosphoryliert die GSK-3 die N-terminale Domäne von  $\beta$ -Catenin, was die Voraussetzung für den Abbau dieses Proteins ist. Werden die Zellen durch Wnt-Proteine stimuliert, kommt es zur Inaktivierung der GSK-3, dadurch akkumuliert  $\beta$ -Catenin in der Zelle.  $\beta$ -Catenin ist verantwortlich für Bindung von TCF/LEFs an die DNA und stellt damit das Effektormolekül für die Genaktivierung dar.<sup>71,73</sup> Wenn die Bindung des Liganden an den Wnt-Rezeptor-Komplex ausbleibt, kommt es zur Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins durch CK1 $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  an Ser45 und durch GSK-3 $\alpha/\beta$  an Ser41, Ser37 und Ser33. Ermöglicht wird dieser Vorgang durch die Ausbildung eines Destruktionskomplexes, bestehend aus den Tumor-Suppressor-Proteinen Axin und APC sowie den Kinasen.<sup>74</sup> Axin bildet das Gerüst dieses Komplexes und interagiert direkt mit den anderen Komponenten. Nach der Phosphorylierung erfolgt der Abbau durch das Proteasom. Erfolgt die Bindung von Wnt-Proteinen an deren Rezeptoren, die sog. Frizzled-Proteine (Fz), kommt es zur Komplexbildung von Fz und LRP5/6. Der Frizzled-Rezeptor ist ein aus 7 Domänen bestehender Transmembrankomplex mit einem N-terminalen, cysteinreichen Extrazellularabschnitt, der die Bindung des Wnt-Proteins ermöglicht und zusätzlich



mit dem Protein Dishevelled (Dvl) interagiert. Weder dessen genaue Funktion, noch auf welche Weise die Phosphorylierung von Dvl reguliert wird, ist geklärt. Eine wichtige Komponente im Rezeptorkomplex ist LRP5/6. Dies ist ein Korezeptor, an dessen cytosolischem Abschnitt Axin bindet. Die Bindung von Wnt induziert die Phosphorylierung von LRP5/6 durch CK1 $\gamma$  und GSK-3  $\alpha/\beta$ , was nachfolgend die Bindung von Axin reguliert. Axin steht dem Destruktionskomplex nicht länger zur Verfügung, in der Folge stabilisiert sich das  $\beta$ -Catenin. Nach Translokation in den Nukleus ersetzt  $\beta$ -Catenin den Transkriptionssuppressor Groucho und aktiviert die Transkription der durch TCF regulierten Gene.<sup>75</sup>

Abbildung 2.2: Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade (modifiziert nach Clevers<sup>75</sup>)



Mangelnde Kontrolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathways kann durch gesteigerte Zellproliferation zu Tumorwachstum führen. Die Manifestierung von Krebs durch anomale Wnt-Signaltransduktion resultiert aus einer unangepassten Genaktivierung durch Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. Mutationen des  $\beta$ -Catenins, die die Phosphorylierung durch die GSK-3 verhindern, wurden in verschiedenen Krebstypen gefunden.<sup>71</sup> Neben diesem Einfluss auf Krebsentstehung ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway massgeblich an der embryonalen Entwicklung und der Gewebsneubildung beteiligt. Defekte in der Wnt-Signaltransduktion führen in Mäusen zu schweren Entwicklungsstörungen. Die GSK-3 markiert in dieser Signalkaskade eine wichtige Schaltstelle. In der unstimulierten Zelle wirkt sie inhibitorisch durch die Beteiligung am Abbau des  $\beta$ -Catenins, gegensätzlich dazu verhält sie sich nach Wnt-Stimulus. Die Balance in dieser Signalübertragung kann durch Mutationen gestört werden und zu pathologischen Zuständen führen. Einsatz von GSK-3-Inhibitoren führte zu einer erhöhten Konzentration an  $\beta$ -Catenin in transformierten Zelllinien.<sup>76</sup> Dies legt die Vermutung nahe, dass GSK-3-Inhibition über einen längeren Zeitraum zu Krebs führen könnte. Viele Beobachtungen sprechen jedoch dagegen. Lithium, das als GSK-3-Inhibitor lange Zeit bei der Behandlung bipolarer Affektivitätsstörungen eingesetzt wurde, trägt nicht zu einem erhöhten Krebsrisiko bei.<sup>77</sup> In diesem Zusammenhang muss auch die Dauer der GSK-3-Inhibition betrachtet werden. Beispielsweise bewirkt Insulin eine nur ca. 40 Minuten andauernde, lediglich 40-50 prozentige Inhibition der GSK-3, um die Glycogensynthase zu aktivieren.<sup>66</sup> Die GSK-3 ist physiologisch aktiv, kurze Episoden der Blockade sollten nicht zu kritischen  $\beta$ -Catenin-Spiegeln führen.<sup>19,78</sup> Der therapeutische Nutzen von GSK-3-Inhibitoren scheint auch gerade hinsichtlich des Eingriffs in den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway denkbar. Wnt-Signaltransduktion stimuliert die  $\beta$ -Zellproliferation des Pankreas.<sup>79</sup> Die murine und humane Stammzellentwicklung wird durch den Wnt-Stimulus beeinflusst.<sup>80</sup> Diese Ergebnisse sind positive Indizien für den potenziellen Einsatz von GSK-3-Inhibitoren, um das Wnt-Signal zu imitieren. Um das Krebsentstehungsrisiko abschließend zu bewerten, sollten noch weitere Langzeituntersuchungen mit GSK-3-Inhibitoren im Tierversuch durchgeführt werden.<sup>19</sup> Aktuelle interdisziplinäre Untersuchungen widmen sich den zusätzlichen noch unverstandenen physiologischen Funktionen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathways.<sup>75</sup> Beispielsweise wurde die Entwicklung von Hydroidpolypen nach Applikation des selektiven GSK-3-Inhibitors 1-Azakenpaullon beobachtet. Die erhaltenen Ergebnisse

lassen auf eine frühe Entstehung und eine lange Erhaltung Wnt-Signalkaskade in der Evolution schließen.<sup>81,82</sup>

### 2.2.3 GSK3 in der Hedgehog-Signalkaskade

Zwischen der Hedgehog- und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade bestehen einige Parallelitäten. Wnt und Hedgehog (Hh) sind Signalproteine, die in die embryonale Entwicklung involviert sind und häufig konzertiert wirken. Im Vergleich zu Wnt, wo  $\beta$ -Catenin in den Nukleus eindringt und als Signaltransduktor wirkt, sind in der Hedgehog-Signalkaskade die Proteine Cubitus interruptus (Ci, in Fliegen) bzw. Gli (in Wirbeltieren) für diese Signalübertragung verantwortlich.<sup>83</sup> Anders als bei  $\beta$ -Catenin in der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade führt das Ausbleiben des Hh-Signals nicht zum vollständigen Abbau von Ci bzw. Gli. Es kommt zur Phosphorylierung von Ci durch GSK-3, PKA und CK1; dabei entsteht ein kürzeres Ci-Segment, welches als Transkriptions-Suppressor wirkt. Bei Stimulus durch Hh verbleibt Ci in der ursprünglichen Form und wirkt als Transkriptionspromotor. In Vertebraten erfolgt eine ähnliche, jedoch etwas kompliziertere Prozessierung.<sup>84</sup> Der GSK-3 kommt wie schon in der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade eine janusköpfige Rolle zu. In unstimulierten Zellen ist sie neben PKA und CK1 am Abbau von Gli beteiligt und wirkt somit als negativer Regulator in der Hedgehog-Signalkaskade. Bei Inhibition von GSK-3 $\beta$  in stimulierten Zellen kommt es zur Abschwächung der Signaltransduktion.<sup>85</sup> Dies wird begründet mit der Phosphorylierung des Gli-Suppressors Sufu durch GSK-3 $\beta$ , der in der Folge Affinität zu Gli einbüßt. Auf diese Weise kann Gli als Transkriptionspromotor fungieren. Diese Ergebnisse lassen auf eine GSK-3 $\beta$  bedingte positive Regulation des Hedgehog-Pathway in stimulierten Zellen schließen.<sup>86</sup>

Gemeinsamkeiten zwischen der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Hedgehog-Signalkaskade finden sich nicht nur in der Art der Signalübertragung, sondern auch in ihren Funktionen. Die beiden Signalkaskaden sind in Gewebswiederherstellung und Stammzellenrenewierung eingebunden. Hieraus können sich pathologische Konsequenzen ergeben, etwa durch die Bildung von Krebsstammzellen, die in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielen. Mutationen, die die Wnt- und Hh-Pathways stark aktivieren, treten mit einer gehäuften Inzidenz in verschiedenen

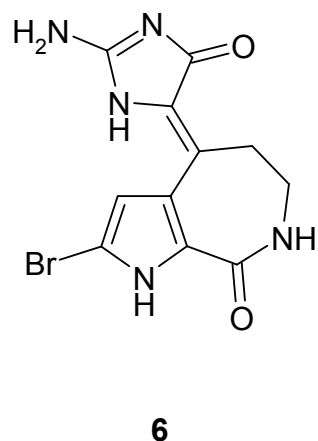
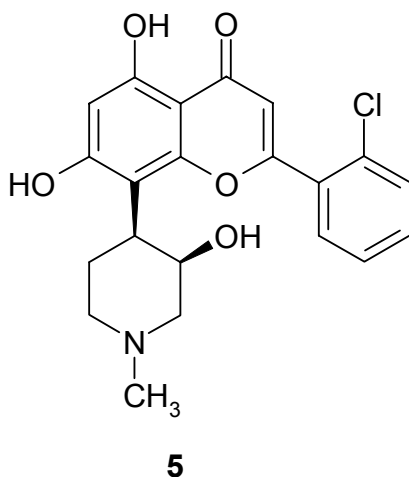
Krebsarten auf. Häufig entwickelt sich Krebs in den Organen, in denen Wnt- und Hh-Pathway die Stammzellerneuerung kontrollieren. Eingriff in diese Signalkaskaden verspricht eine mögliche Option bei der Therapie von verschiedenen Krebsarten. Dies bedingt jedoch ein noch genaueres Verständnis der angesprochenen Signalkaskaden.<sup>87</sup>

## 2.3 Inhibitoren der Glycogen Synthase Kinase-3

Einer der ersten GSK-3-Inhibitoren war Lithium, welches lange als Therapeutikum bei bipolarer Affektivitätsstörung eingesetzt wurde. In neuerer Zeit sind eine Reihe von Substanzen entwickelt worden, die eine gute Potenz und Selektivität aufweisen. Die meisten dieser Verbindungen sind kleine Moleküle, die kompetitiv in der ATP-Bindetasche angreifen.<sup>19</sup> Im Folgenden soll auf die wichtigsten Substanzklassen eingegangen werden.

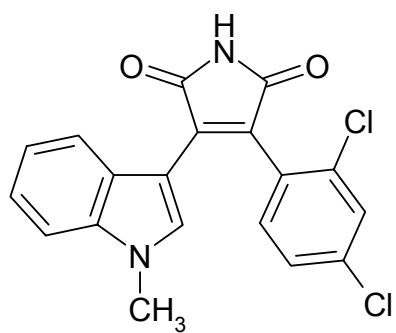
### 2.3.1 Flavopiridol und Hymenialdisin

Zwei Verbindungen, die neben der GSK-3 auch eine Reihe anderer Kinasen hemmen, sind Flavopiridol (**5**) und Hymenialdisin (**6**). Ersteres ist ein optimiertes Derivat einer Flavon-Leitstruktur, die 1988 aus der Rinde von *Dysoxylum binectariferum* isoliert und totalsynthetisch zugänglich gemacht werden konnte.<sup>88</sup> Das synthetisch hergestellte Flavopiridol hemmt die GSK-3 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 450 nM und ist ein noch stärkerer Inhibitor für CDK1, -2, -4 und -7. Zurzeit befindet sich Flavopiridol in verschiedenen klinischen Studien, teilweise schon in der Prüfphase 2.<sup>89</sup> Marinen Ursprungs ist das aus einem Schwamm isolierte Hymenialdisin. Ähnlich wie Flavopiridol ist Hymenialdisin ein Multikinase-Inhibitor mit Präferenz für verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe. Neben hoher Affinität für CDK1/Cyclin B (IC<sub>50</sub>-Wert: 22 nM) und CDK5/p25 (IC<sub>50</sub>-Wert: 28 nM) wird die GSK-3 $\beta$  mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10 nM am stärksten gehemmt.<sup>90</sup>

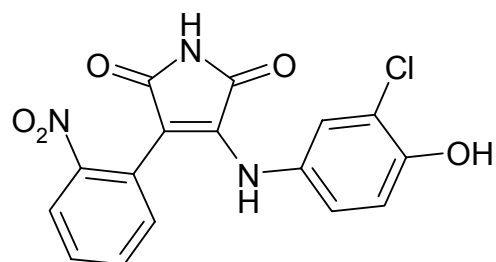


### 2.3.2 Maleinimide

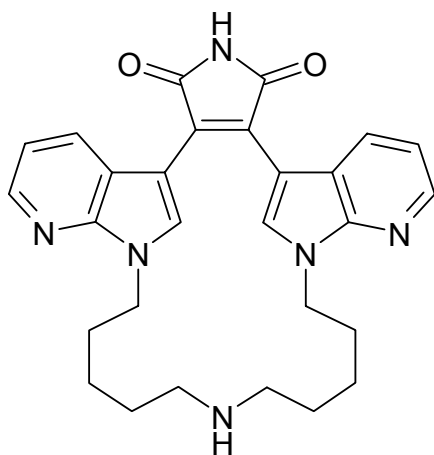
Erste Verbindungen, die die GSK-3 im submikromolaren Bereich hemmen, waren Maleinimide, die bei GlaxoSmithKline dargestellt wurden. Die Verbindungen SB-216763 (**7**) und SB-415286 (**8**) zeigten neben guten IC<sub>50</sub>-Werten von 34 nM bzw. 78 nM an GSK-3 $\alpha$  auch eine insulinähnliche Wirkung im Zellmodell<sup>76</sup>. Eine Reihe von weiteren Derivatisierungen wurden im Bereich der Substituenten in Position 3 und 4 vorgenommen. Das Einführen von Azaindoly<sup>-91</sup> (**9**), Indoly<sup>-92</sup> (**10**), Anilino- und Arylresten<sup>56</sup> (**11**) führte zu Verbindungen, die strukturell dem promiskuitiven Kinase-Hemmstoff Staurosporin ähnelten,<sup>92</sup> aber im Verlauf des präklinischen Entwicklungsprozesses deutliche Selektivität für die GSK-3 erreichten. Neuste Vertreter der Maleinimid-Familie sind makrozyklische Pyridiophane (**12**), die die GSK-3 im nanomolaren Bereich hemmen,<sup>93</sup> sowie Derivate mit Indazoly<sup>-94</sup> (**13**) bzw. Benzofuryl<sup>95</sup>-Substitution (**14**).



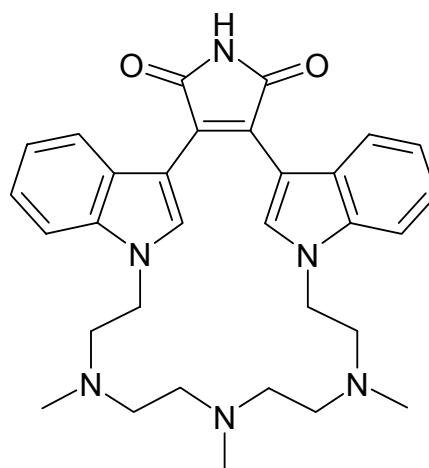
7



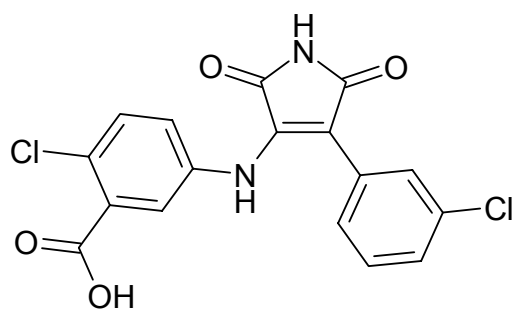
8



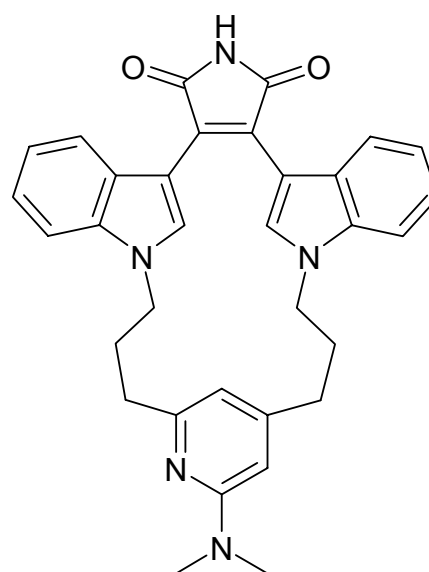
9



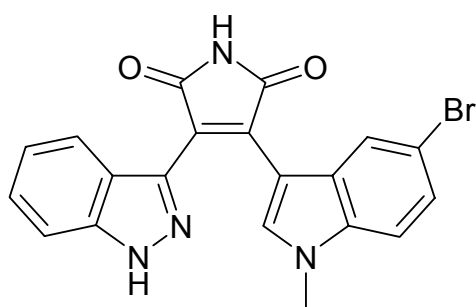
10



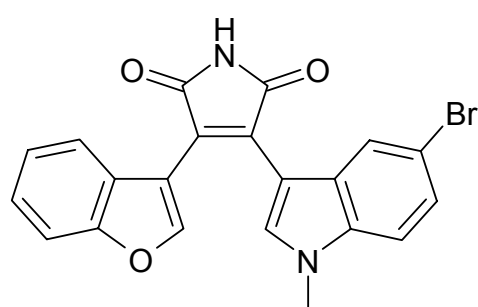
11



12



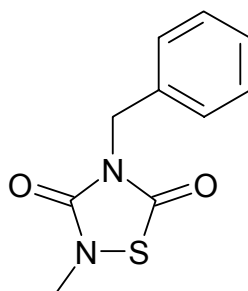
13



14

### 2.3.3 Thiadiazolidinone

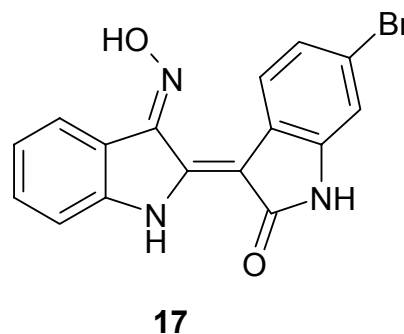
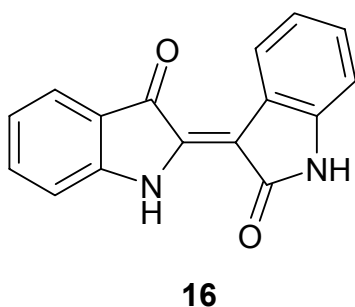
Die Gruppe der Thiadiazolidinone sind die ersten Vertreter von GSK-3-Inhibitoren, von denen eine nicht-ATP-kompetitive Hemmung berichtet wurde. Auswertungen der Enzymkinetiken und die Hypothese, dass Verbindung **15** in der GSK-3 $\beta$  mit Arg96, Lys205 und Tyr216 der Oxyanion-Bindetasche wechselwirkt, waren die Basis für diese Annahme.<sup>96</sup> Nachfolgend durchgeführte Mapping-Studien zeigten jedoch, dass es auch zur Belegung der ATP-Bindetasche durch Vertreter dieser Verbindungsklasse kommt.<sup>97</sup> Röntgenstrukturanalysen der Inhibitoren im Kokristallisat mit der GSK-3 oder Mutation der o. g. Aminosäuren mit anschließender Testung der Inhibitoren könnten hier zum Verständnis des Bindungsmodus beitragen. Screening der Thiadiazolidinone gegen verschiedene Kinasen zeigte Präferenz für die GSK-3 $\beta$ , die allerdings nur im mikromolaren Bereich gehemmt wird.<sup>96,97</sup>



15

### 2.3.4 Indirubine

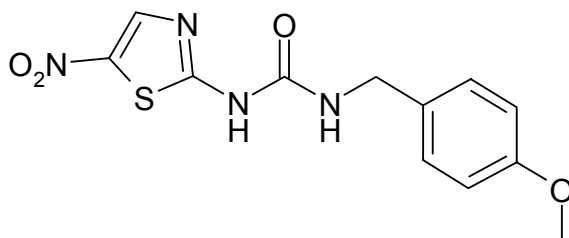
Das Bisindol Indirubin (**16**) ist als aktiver Inhaltsstoff aus Rezepturen der traditionellen chinesischen Medizin hervorgegangen, die als Medikamente bei chronischen Krankheiten, wie beispielsweise Leukämie, eingesetzt werden. Verschiedene Derivatisierungen haben Indirubine hervorgebracht, die sich in unterschiedlichen biologischen Testungen als potenzielle Wirkstoffe empfohlen haben. Indirubine, die in den Positionen 3' und 7 substituiert sind, zeigen Apoptose-induzierende Eigenschaften in Tumorzelllinien,<sup>98</sup> während 3' und 5 substituierte Indirubine potente Inhibitoren der Kinasen CDK1 und -5 sowie der GSK-3 darstellen.<sup>99</sup> Stärkste Inhibition der GSK-3 und der CDK5/p25 zeigt das Derivat 6-Bromindirubin-3'-oxim (**17**), welches mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 5 nM über sechzigmal stärker an die GSK-3 bindet als an den CDK1/Cyclin B-Komplex. Der Grund hierfür liegt in der sterischen Hinderung zwischen dem Brom-Substituenten und den Gatekeepern der ATP-Bindetaschen von CDK1 und -5. Als Gatekeeper wird eine Aminosäure bezeichnet, die je nach Größe in der Lage ist den Zutritt zu tieferen Abschnitten in der Bindetasche zu blockieren.<sup>100</sup> In beiden Kinasen findet sich das sterisch anspruchsvolle Phe80, während in der GSK-3 das flexiblere, kleinere Leu132 als Gatekeeper fungiert, das den Bromsubstituenten des 6-Bromindirubin-3'-oxims besser toleriert.<sup>101</sup> Die Eigenschaften von BIO wurden in verschiedenen biologischen Testsystemen bewertet, so zeigt sich beispielsweise eine proliferationsanregende Wirkung in Säugerkardiomyozyten.<sup>102</sup>





### 2.3.5 AR-014418

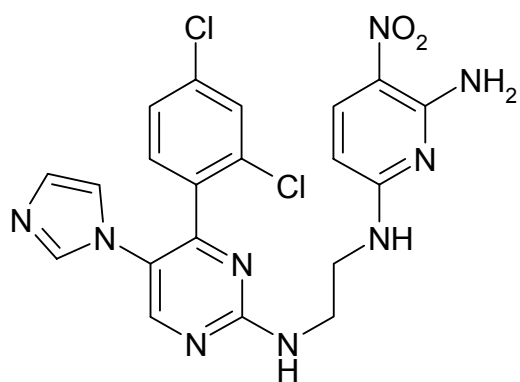
Bei AstraZeneca wurde ein ATP-kompetetiver Inhibitor mittels Hochdurchsatztestsystems identifiziert. Bei der Verbindung AR-014418 (**18**) handelt es sich um ein Thiazol-Derivat, das in umfangreichen Testungen auf Leitstruktureigenschaften überprüft wurde. Aus den Ergebnissen eines Screenings an 26 Kinasen geht hervor, dass die GSK-3 $\beta$  mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von ca. 100 nM gehemmt wird. Die Aktivitäten der anderen Kinasen im Test wurden nicht beeinflusst, selbst für die strukturell verwandten Kinasen CDK2 und -5 wurden IC<sub>50</sub>-Werte von über 100  $\mu$ M ermittelt. Diese Selektivität gegenüber der CDK2 lässt sich durch die Orientierung von AR-014418 in der ATP-Bindetasche erklären. Wie schon beim Bindungsmodus von BIO beobachtet, kommt es zu sterischen Hinderungen mit dem Gatekeeper in der CDK2. Hierfür verantwortlich ist die Nitro-Gruppe, die durch die Ausrichtung des Molekülgerüsts in der Bindetasche in zu engem Kontakt zum Phe80 steht. Das Äquivalent in der GSK-3, das Leu132, toleriert diese Ausrichtung und ermöglicht so die ausgeprägten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen. Primär sind dies bindungsverstärkende Interaktionen zwischen dem planaren NO<sub>2</sub>-Thiazolfragment und Cys199 und die wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen zum Val135 im Backbone der GSK-3. Zusätzlich zum Kinase-Screening wurde der Inhibitor auf neuroprotektive Eigenschaften gegenüber N2A Neuroblastoma-Zellen hin untersucht, die toxischen Bedingungen ausgesetzt wurden. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass **18** als Leitstruktur für die Entwicklung von potenziellen GSK-3-Inhibitoren zum Einsatz gegen Morbus Alzheimer und andere neurodegenerative Erkrankungen in Frage kommt.<sup>65</sup>



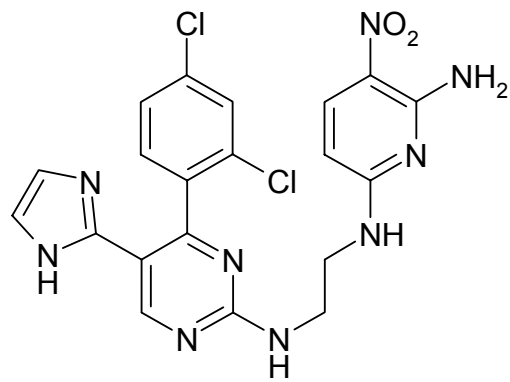
**18**

### 2.3.6 Chiron-Inhibitoren

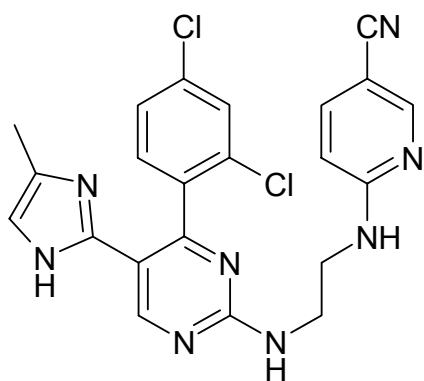
Zu den am weitesten fortgeschrittenen GSK-3-Inhibitoren gehören die Verbindungen, die bei Chiron dargestellt wurden. Vertreter dieser Verbindungsklasse weisen Pyrimidin- und Pyridin-Teilstrukturen auf, die durch eine Ethylendiamineinheit verbunden sind. Im Lauf der Evolution dieser Verbindungen wurden die Vertreter hinsichtlich aller medizinisch-chemisch relevanten Parameter optimiert. Der Entwicklungszyklus brachte die frühen klinischen Kandidaten (early clinical candidates) CT 99021 (**21**) und CT 20026 (**22**) hervor, die durch gute GSK-3-Selektivität imponieren und ein interessantes Wirkprofil in verschiedenen biologischen Tests zeigten. Anhand der vier abgebildeten Inhibitoren lässt sich ein Teil der Entwicklung widerspiegeln. CT 98014 (**19**) inhibiert die GSK-3 $\beta$  mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 580 pM und reduzierte in Ratten mit diabetischer Stoffwechsellage bei einer Dosierung von 30 mg/kg die Blutglucose-AUC um 25% in einem oralen Glucosetoleranztest (oGTT). Schlechte Löslichkeit dieses Inhibitors führte zur Entwicklung von CT 98024 (**20**), bei dem durch Rotation des Imidazol-Substituenten ein zusätzlicher Wasserstoffbrücken-Donor im Molekül installiert wurde. Bei ähnlicher Potenz im Kinaseassay und im oGTT verbesserte sich die Löslichkeit, so dass diese Verbindung in Citrat-gepuffertem Wasser verabreicht werden konnte. Pharmakokinetische Aspekte führten zur Entwicklung von **21** und **22**, die den zuvor entwickelten Substanzen im Hinblick auf die Halbwertszeit deutlich überlegen waren (CT 98024: 46 min. oral  $t_{1/2}$  in Ratten, CT 99021: 92 min. oral  $t_{1/2}$  in Ratten, CT 20026: 205 min. oral  $t_{1/2}$  in Ratten). Diese Optimierungen verliefen unter Erhalt der Wirksamkeit in den biologischen Tests. Zusätzliche Ergebnisse lieferten die Applikation von CT 20026 an Affen mit diabetischer Stoffwechsellage und die Langzeitbehandlung von Ratten mit demselben Inhibitor. In den Primaten führte die orale Verabreichung zu verbesserter Glucosetoleranz im oGTT. Im Langzeittest zeigte sich in den Ratten ein verbesserter HbA1c-Wert und erhöhte Plasmainsulinspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe.<sup>68</sup> Diese breite Untersuchung des Wirkprofils und die positiven Ergebnisse der verschiedenen Tests unterstreichen das Potenzial dieser Verbindungen.



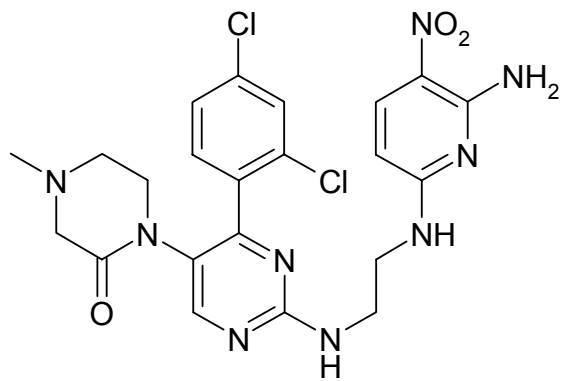
19



20



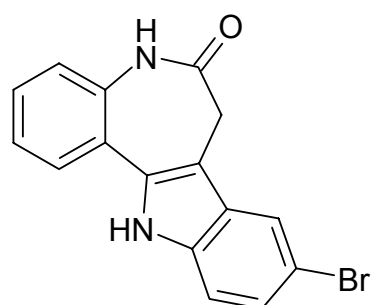
21



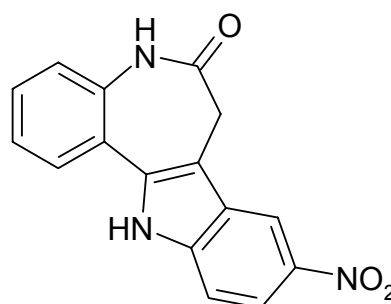
22

### 2.3.7 Paullone

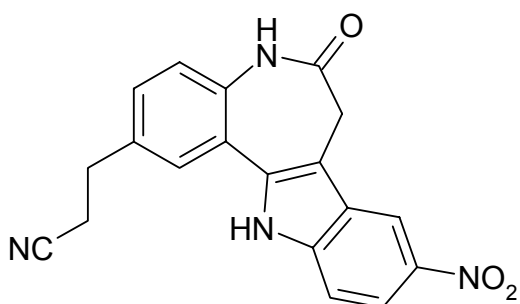
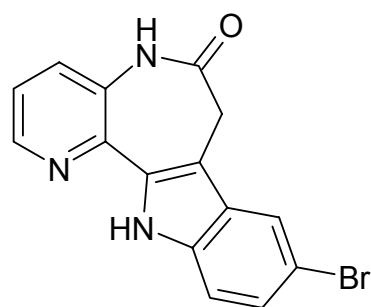
Beim Anticancer Drug-Screening des National Cancer Institute zeigten verschiedene Indolobenzazepinone, sog. Paullone, antiproliferative Wirkung auf humane Krebszelllinien.<sup>103</sup> Wichtigste Vertreter dieser Substanzklasse sind Kenpaullon (**1a**) und Alsterpaullon (**1b**). Neben der antiproliferativen Wirkung sind beide Derivate potente Inhibitoren an CDK1/Cyclin B, CDK5/p25 und GSK-3 $\beta$ . Während Kenpaullon den CDK1/Cyclin B-Komplex mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 400 nM und die GSK-3 $\beta$  mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 23 nM hemmt, zeigt Alsterpaullon noch stärkere Inhibition. Mit IC<sub>50</sub>-Werten von 35 nM an CDK1/Cyclin B, 40 nM an CDK5/p25 und 4 nM an GSK-3 $\beta$  ist Alsterpaullon ein potenter Kinasehemmstoff,<sup>104</sup> der vielfach als GSK-3 $\beta$ -Hemmer eingesetzt wird und kommerziell erhältlich ist. Dies wird vor allem in zellbasierten Assays deutlich, da Alsterpaullon unter diesen Bedingungen noch stärkere Selektivität für GSK-3 $\beta$  aufweist.<sup>104,105</sup> Weitere Fortschritte in der Entwicklung des Alsterpaullons führten zu noch potenteren Derivaten, wie dem 2-Cyanoethyl-Alsterpaullon (**1c**) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 800 pM an GSK-3 $\beta$ .<sup>106</sup> Die relativ schlechte Löslichkeit des Alsterpaullons wurde durch Anknüpfung von PEG-Seitenketten am Indolstickstoff verbessert.<sup>107</sup> Die Substanzklasse der Paullone ist vielfältig derivatisiert<sup>108</sup> und charakterisiert worden,<sup>43</sup> was zu Verbindungen mit interessantem Wirkprofil geführt hat. Mit der Darstellung von 1-Azakenpaullon (**2a**) ist es gelungen, einen GSK-3 $\beta$ -Inhibitor zu entwerfen, der 111fache Selektivität gegenüber CDK1/Cyclin B besitzt und die GSK-3 $\beta$  mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 18 nM hemmt.<sup>57</sup> Dieser Inhibitor ist ebenfalls kommerziell verfügbar gemacht worden und fand somit weite Verbreitung in den unterschiedlichsten Aufgabenstellungen.<sup>17,109,110</sup>



**1a**

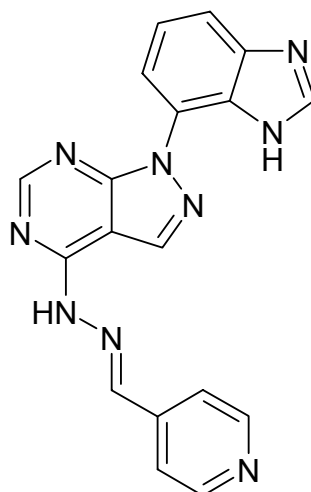


**1b**

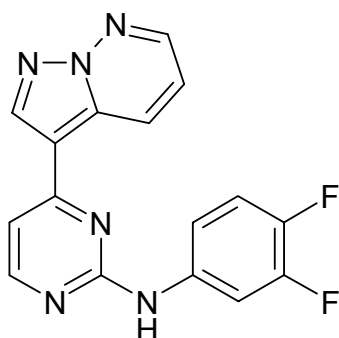
**1c****2a**

### 2.3.8 Weitere GSK-3-Inhibitoren

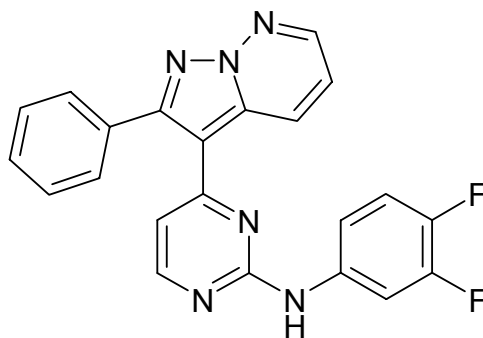
GlaxoSmithKline berichtet von der Synthese von GSK-3-Inhibitoren mit einem Pyrazolopyrimidin-Grundkörper. Die Verbindungen wurden auf GSK-3-Inhibition und auf Glycogen Synthase-aktivierende Eigenschaften getestet. Leider wurden die Verbindungen nicht auf Inhibition von anderen Kinasen überprüft. Derivate mit Benzimidazolyl-Substitution in Position 1 zeigten neben niedrigen  $IC_{50}$ -Werten auch die beste Zellpermeation mit anschließender GS-Aktivierung. Verbindung **23** ( $IC_{50}$ -Wert an GSK-3: 4 nM) erreichte 45 % der maximal durch 1  $\mu$ M Insulin hervorgerufenen Glycogenkonzentration in Skelettmuskelzelllinien von Ratten.<sup>111</sup> Die Arbeitsgruppe charakterisierte in den gleichen Testsystemen auch Substanzen, die GSK-3-Selektivität gegenüber CDK2 aufweisen. Erneut wurden sterisch anspruchsvolle Substituenten eingeführt, die in räumlichem Konflikt mit dem Phe80-Gatekeeper stehen. Diese Vorgehensweise resultierte in Verbindungen mit einer 1600fachen Selektivität gegenüber CDK2, ohne die Zellpermeation negativ zu beeinflussen. Verbindung **24** inhibiert die GSK-3 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 10 nM und die CDK2 noch stärker mit 2 nM. Durch Einführen des Phenylrests in Position 2 der Verbindung **25** ergibt sich ein  $IC_{50}$ -Wert von 10 nM an GSK-3 und von >20 nM an CDK2. Die erreichte GS-Aktivierung entsprach bei Verbindung **24** 38 %, bei Verbindung **25** 69 % der maximal durch Insulin induzierbaren GS-Aktivität.<sup>112</sup>



23



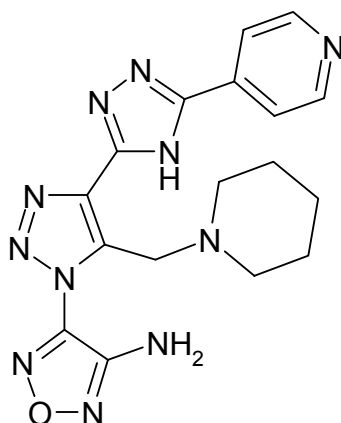
24



25

Weitere heterozyklische Verbindungen mit Aminofurazan- und Triazol-Grundstruktur wurden bei Novo Nordisk entwickelt und auf Kinaseinhibition getestet. Die publizierten Inhibitoren besitzen eine ca. 100fache Selektivität für die GSK-3 gegenüber der CDK2. In weiteren Assays wurde die GS-Aktivierung bewertet und untersucht, inwieweit es durch die Verbindungen zum verminderten  $\beta$ -Catenin-Abbau kommt. Verbindung **26** zeigte fünffach stärkere Aktivierung der GS im Vergleich zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin.<sup>113</sup> Docking-Experimente und Moleküldynamik-Simulationen geben Einblick in das Bindungsverhalten des Inhibitors. Auch dieses Derivat hemmt die GSK-3 $\beta$  ATP-kompetitiv mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 280 nM (IC<sub>50</sub>-Wert an CDK2: >250  $\mu$ M). Die Autoren begründen die

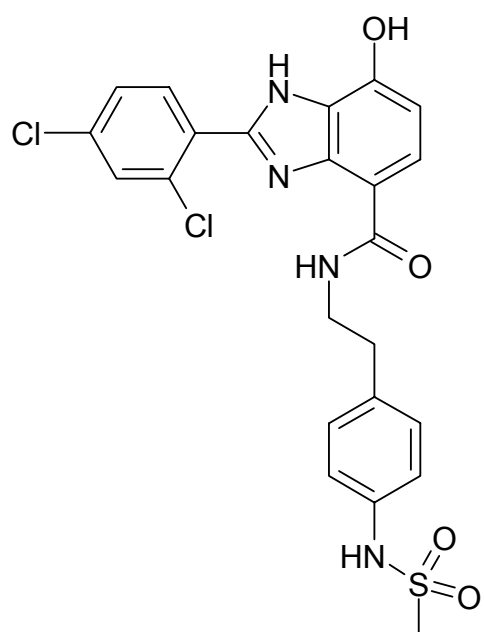
Selektivität mit dem Ausbilden eines stabilen Netzwerkes aus Salzbrücken zwischen Lys85 und Glu97 der GSK-3 mit dem Stickstoff in Position 2 des 1,2,4-Triazols der Verbindung **26**. Zusätzliche van-der-Waals-Kräfte und die Streckung des Moleküls über die gesamte Kavität verstärken die Bindung. In der CDK2 kommt es nicht zu dieser Einpassung in die Bindetasche.<sup>114</sup>



26

Eine kürzlich erschienene Publikation stellt GSK-3-Inhibitoren mit Benzimidazol-Grundstruktur vor.<sup>115</sup> Durch Röntgenkristallographie konnte der Bindungsmodus dieser Inhibitoren erklärt werden. Die NH-Funktion der Imidazol-Teilstruktur sowie die Hydroxy-Funktion in Position 7 gehen dabei Wasserstoffbrückenbindungen zu Val135 und Asp133 der Hinge-Region ein. Innerhalb der publizierten Verbindungen bewirkt Verbindung **27** die stärkste Inhibition mit 15 nM an GSK-3 $\beta$ . Leider sind in dieser Publikation keine Daten über die Inhibition verwandter Kinasen enthalten, so dass kein Selektivitätsprofil abgeleitet werden kann.

31



27



### 3. Transkriptionsfaktor Pax4

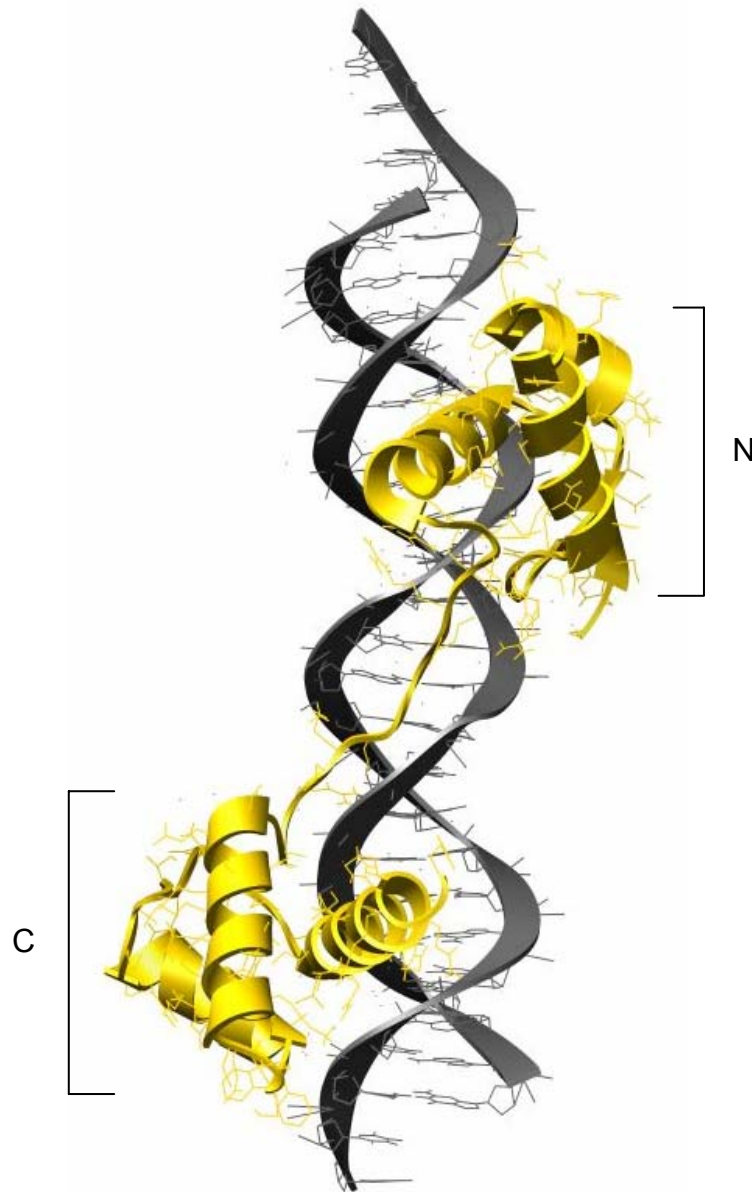
#### 3.1 Aufbau, Regulation und Funktion von Pax-Proteinen

Die Gruppe der untereinander verwandten paired box-Gene (Pax) sind wichtige Schaltstellen im Entwicklungsprozess von Organismen. Seit ihrer Entdeckung sind sie in verschiedenen Lebewesen isoliert worden; allein im humanen Genom finden sich 9 Pax-Gene,<sup>116</sup> die je nach Funktion und Sequenzähnlichkeit in vier weitere Untergruppen aufgeteilt werden.<sup>117</sup> Diese Genfamilie codiert für eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, denen Schlüsselpositionen bei der Erhaltung der Pluripotenz von Stammzellen zukommen. Pax-Proteine werden definiert über ihre 128 Aminosäuren enthaltende DNA-Bindungsdomäne, die sog. paired domain (PD), welche sequenzspezifische Kontakte mit der DNA eingeht. Die Analyse der Röntgenkristallstruktur weist auf zwei Subdomänen hin, die jeweils aus einer Helix-Turn-Helix-Struktur (HTH) bestehen. Diese spezielle Struktur ist Bestandteil der Homöodomänen, die für die Bindung des Proteins an die Zielgene verantwortlich sind. Diese aus 60 hoch konservierten Aminosäuren bestehenden DNA-Bindungsdomänen sind in allen Hox-Genprodukten (Homöobox) zu finden. Die PD besteht aus zwei Homöodomänen (N- und C-terminal), die über einen Linker verbrückt sind<sup>118</sup> (Abbildung 3-1). Das Verständnis der DNA-Erkennung durch die PD ist trotz der erhaltenen strukturellen Information aufgrund der Komplexität und Diversität ein forderndes Problem, gerade unter Berücksichtigung der verschiedenen Konformationen und Kombinationen der möglichen DNA-Protein-Bindungen. Die Proteine Pax3, Pax4, Pax6 und Pax7 enthalten eine zusätzliche Homöodomäne, die ebenfalls an der DNA-Bindung beteiligt ist. Ein hochkonserviertes Oktapeptid stellt ein weiteres Merkmal der Pax-Proteine dar. Es findet sich in allen Pax-Proteinen, außer in Pax4 und Pax6.<sup>117</sup> Die Steuerung der Transkriptionsaktivität kann durch Repressoren gesteuert werden, die z. B. an das Oktapeptid binden. Einige der Pax-Proteine zeigen eine konzentrationsabhängige Aktivität: eine geringe Protein-Konzentration steigert die Transkriptionsrate, hohe Konzentrationen wirken entgegengesetzt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass strukturelle und funktionelle Untersuchungen der Pax-Proteine auf eine modulare Struktur sowie komplexe DNA-Bindungseigenschaften hinweisen. Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren wird

durch Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst.<sup>119</sup> Die Zielorgane und -gewebe, nähere strukturelle Informationen sowie Chromosomenlokalisierung und assoziierte Krankheiten sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Abbildung 3-1: Paired domain von Pax6 mit kokristallisierter DNA



Paired domain von Pax6 (*goldfarben*), kokristallisierte DNA (*grau*); erstellt mit Chimera<sup>120</sup> (PDB: 6Pax<sup>118</sup> ).

Tabelle 3-1: Die Pax-Genfamilie in Säugern, geordnet nach struktureller Ähnlichkeit

Gen	Vorhandene Domänen <sup>a</sup>				Zielorgane/-gewebe	Chromosom <sup>b</sup>	Assoziierte Krankheiten
	PD	OP	HD1	HD2/3			
Pax1	x	x			Skelett, Thymus	20p11	Ologidontia
Pax9	x	x			Skelett, Zähne	14q12-q13	
Pax2	x	x	x		ZNS, Niere	10q25	Renales Kolobom-Syndrom
Pax5	x	x	x		ZNS, B-Lymphozyten	9p13	Großzelliges Lymphom
Pax8	x	x	x		ZNS, Niere, Schilddrüse	2q12-q14	Schilddrüsensyndysplasie
Pax4	x		x	x	Pankreas	7q	Aniridia, Katarakt
Pax6	x		x	x	ZNS, Augen, Pankreas	11p13	
Pax3	x	x	x	x	ZNS, Skelettmuskulatur, Neuralleiste	2q35	Waardenburg-Syndrom, Rhabdomyosarkom
Pax7	x	x	x	x	ZNS, Skelettmuskulatur, Neuralleiste	1p36.2	Rhabdomyosarkom

<sup>a</sup>Domänen: Paired domain (PD), Oktapeptid (OP), Helix 1 der Homöodomäne (HD1), HTH-Struktur der Homöodomäne (HD2/3); <sup>b</sup>Position auf der humanen Genkarte (modifiziert nach *Chi*<sup>119</sup>)

### 3.2 Stammzelltherapie des Diabetes mellitus

Die hyperglycämischen Zustände, die bei Diabetes mellitus Typ 1 vorzufinden sind, liegen in der fehlenden Masse und Funktion von pankreatischen  $\beta$ -Zellen begründet.<sup>58</sup> Transplantation von pankreatischen Inselzellen ist ein viel versprechendes Konzept bei zukünftigen Behandlungen des Diabetes mellitus, vorausgesetzt die Kultivierung und Ausdifferenzierung von Inselzellen aus Vorläuferzellen gelänge.<sup>121</sup> Für die Nutzung von pankreatischen Stammzellen als Vorläuferzellen ist das größte Hindernis die unzureichende Verfügbarkeit an intaktem transplantierbarem Gewebe, da die adulten Stammzellen nur langsam proliferieren, was eine breite Anwendung limitieren würde. Eine alternative Quelle stellt die Nutzung von embryonalen Stammzellen (ES) dar.<sup>122</sup> Diese Zellen besitzen nahezu unbegrenzte Proliferationsmöglichkeiten unter Beibehaltung der Differenzierungsfähigkeit. Dieser Ansatz müsste dahingehend optimiert werden, dass humane embryonale Stammzellen (hES) direkt in die  $\beta$ -Zell-Ausdifferenzierung gelenkt werden könnten.<sup>123</sup> Zumindest ist bewiesen, dass sich humane embryonale Stammzellen in Insulin-sezernierende Zellen differenzieren können, jedoch nur in sehr geringen Ausbeuten.<sup>124</sup> Es existieren verschiedene Möglichkeiten embryonale Stammzellen so zu beeinflussen, dass sie zu Zellen mit  $\beta$ -zellartigen Funktionen ausdifferenzieren. Neben Nährstoffen wie Glucose, Nicotinamid oder Vitamin A haben auch die Alkaloide Cyclopamin und Conophyllin, sowie die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 in diesem Zusammenhang positive Resultate geliefert.<sup>125</sup> Eine interessante Alternative zu dieser Vorgehensweise ist die Überexprimierung des Transkriptionsfaktors Pax4, der eine entscheidende Rolle in der embryonalen Pankreasentwicklung spielt.<sup>123</sup>

### 3.3 Transkriptionsfaktor Pax4 in der Pankreasentwicklung

Die Expression von Pax4 steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Entwicklung eines intakten pankreatischen Gewebes. Pax4-defiziente Mäuse entwickelten weder Insulin-sezernierende  $\beta$ -Zellen noch Somatostatin produzierende  $\gamma$ -Zellen. Man fand lediglich  $\alpha$ -Zellen, die im Pankreas für die Glukagon-Synthese verantwortlich sind. Expression von Pax4 wurde in Mäusen ab dem ED 9.5 beobachtet,<sup>126</sup> wobei die ersten Insulin-produzierenden Zellen ab ED 8.5 - 9 gefunden wurden.<sup>127</sup> Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pax4 primär für die Proliferation und den Erhalt von ausdifferenzierten  $\beta$ -Zellen verantwortlich ist.<sup>126</sup> Weitere Regulatoren in frühen Entwicklungsstadien der  $\beta$ -Zellen sind neben Pax6 die Homöobox-Transkriptionsfaktoren Nkx2.2, Nkx6.1 und Pdx1, wobei letzterer als Hauptaktivator für alle weiteren Regulatorgene während der Organogenese des Pankreas angesehen wird.<sup>128</sup> Beobachtungen bei Transdifferenzierungsversuchen von murinen Leberzellen zu Insulin-produzierenden Zellen lassen auf eine direkte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Isl-1 und MafA durch Pax4 schließen.  $\beta$ -Zellfunktions-assoziierte Gene konnten durch Expression von Pax4 und Pdx1-VP16 aktiviert werden. Diese Gene werden ebenso wie Isl-1 und MafA erst in späteren Stadien aktiviert, was weiterhin darauf hindeutet, dass Pax4 vor allem die Ausdifferenzierung in späten Stadien triggert.<sup>129</sup> Neben dem Einfluss auf Differenzierung scheint Pax4-Expression wichtig für den Erhalt der  $\beta$ -Zellen zu sein. Überexpression von Pax4 in isolierten murinen und humanen Inseln mit Hilfe von Activin A und Betacellulin, zwei Mitogenen der TGF- $\beta$ - bzw. EGF-Familie, führten zu einer gesteigerten Proliferation und verringerter Apoptose der  $\beta$ -Zellen. Mit diesen Effekten wurde die gleichzeitig auftretende, Pax4-induzierte Expression des antiapoptotisch wirkenden Gens Bcl-xl und des Onkogens c-myc assoziiert.<sup>58</sup> Ähnliche Beobachtungen wurden in Insulinoma-1E-Zellen (INS-1E-Zellen) gemacht. Dort wirkte Pax4 ebenfalls antiapoptotisch über nachfolgende Expression von Bcl-xl, wobei keine Auswirkung auf die Proliferationsrate der Zellen festgestellt wurde.<sup>130</sup> Die aus dem Ratten-Insulinom gewonnenen INS-1E-Zellen stellen ein stabiles  $\beta$ -Zell-Surrogat dar, welches vielfach charakterisiert wurde und breiten Einsatz als  $\beta$ -Zell-Modell gefunden hat.<sup>131</sup> Dieses Modell wurde ebenfalls eingesetzt, um die protektiven und regenerativen Einflüsse von GSK-3-Inhibitoren unter zytotoxischen Bedingungen zu beobachten.<sup>17</sup>

Neben entwicklungsphysiologischen Auswirkungen der Pax4-Expression wurden Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit der Zellpermeation des Pax4-Proteins befassen. Dabei fungiert die paired domain als Protein-Transduktionsdomäne (PTD) und ermöglicht den Eintritt in die Zelle, während andere Strukturelemente (z.B. die Homöodomäne) nicht an der Zellpenetration beteiligt sind. Welche Aminosäuren für die Zellanlagerung und spätere Penetration essentiell sind, ist noch nicht verstanden, allerdings spielt wohl die Makropinozytose bei der Aufnahme der paired domain in die Zelle eine entscheidende Rolle. Obwohl das Pax4-Protein vornehmlich im Zytoplasma der Zelle entdeckt wurde, findet bei länger andauernder Pax4-Protein-Exposition eine verstärkte Translokation in den Zellkern statt. Die carrier-artigen Eigenschaften der PTD könnten dieses Werkzeug zu einer neuen Methode in der Proteineinschleusung machen.<sup>132</sup>

## 4. Rationales Design von GSK-3-Inhibitoren

### 4.1 Röntgenkristallstrukturen der GSK-3

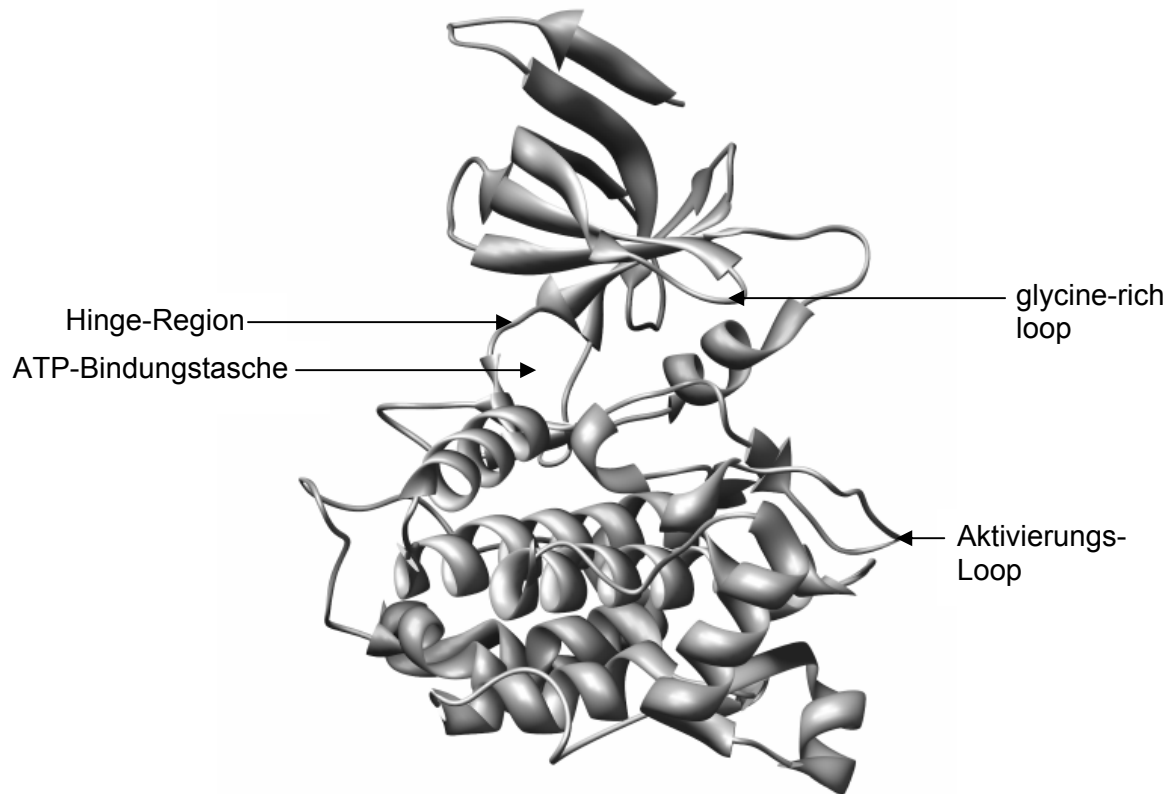
Dreidimensionale molekulare Strukturen von Proteinen sind hilfreich bei der Aufklärung der Proteinfunktion. Vergleiche der Struktur mit verwandten Proteinen legen Gemeinsamkeiten und Unterschiede offen, die Hinweise auf das komplexe Zusammenwirken der Moleküle liefern. Weitere nützliche Informationen lassen sich aus den molekularen Strukturen gewinnen, um physiologisch relevante Mutationen aufzuklären, um Proteininteraktionen zu beschreiben oder wenn neue Bindetaschen identifiziert werden sollen, um Struktur-Aktivitätsbeziehungen bei Ligandenfamilien zu beschreiben.

Die ersten Kristallstrukturen der GSK-3 $\beta$  wurden 2001 veröffentlicht.<sup>61,133</sup> Dadurch wurde gezeigt, dass das Protein eine typische Serin/Threonin-Kinase-Faltung besitzt, mit einer kleinen N-terminalen Domäne (AS 25 – 134) und einer größeren C-terminalen Domäne (AS 135 - 380). Die ATP-Bindetasche ist in der Nähe der Schnittstelle von N- und C-terminaler Domäne lokalisiert und wird dabei von dem glycine-rich loop (AS 60 – 70) sowie der Hinge-Region (AS 134-139) eingeschlossen.

Der Aktivierungs-Loop (T-Loop) beginnt mit dem DFG-Motiv (eine hochkonservierte Schleife bestehend aus Asp200-Phe201-Gly202), endet mit dem APE-Motiv (Ala224-Pro225-Glu226) und bildet eine Begrenzung der Substratbindungsregion (Abbildung 4-1).

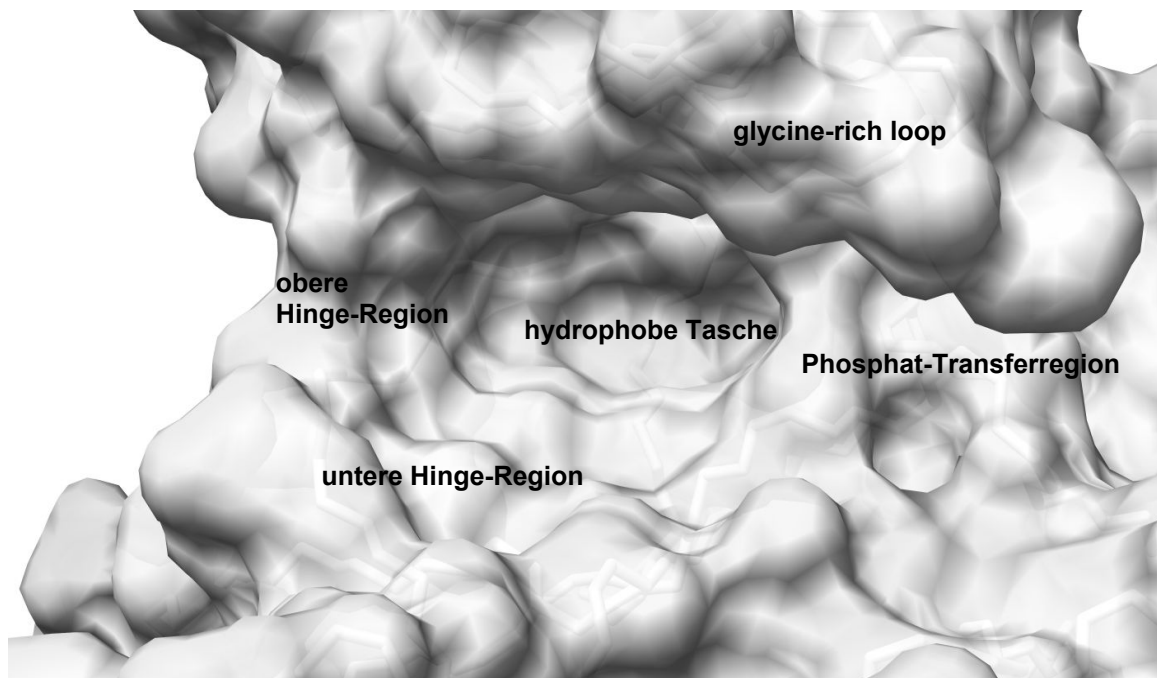
Die Brookhaven Protein Database (PDB) ([www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)) enthält 14 Kristallstrukturen der GSK-3 $\beta$ , wobei es sich jeweils um zwei Apo-GSK-3 $\beta$ -Strukturen, zwei GSK-3 $\beta$ -Peptid-Komplexe und 10 GSK-3 $\beta$ -Komplexe mit kleinen Molekülen handelt<sup>134</sup> (Stand: Oktober 2007).

Abbildung 4-1: Einteilung der GSK-3 $\beta$  in verschiedene strukturelle Bereiche



Erstellt mit Chimera<sup>120</sup>; (PDB-code: 1PYX)

Abbildung 4-2: Einteilung der ATP-Bindungstasche der GSK-3 $\beta$



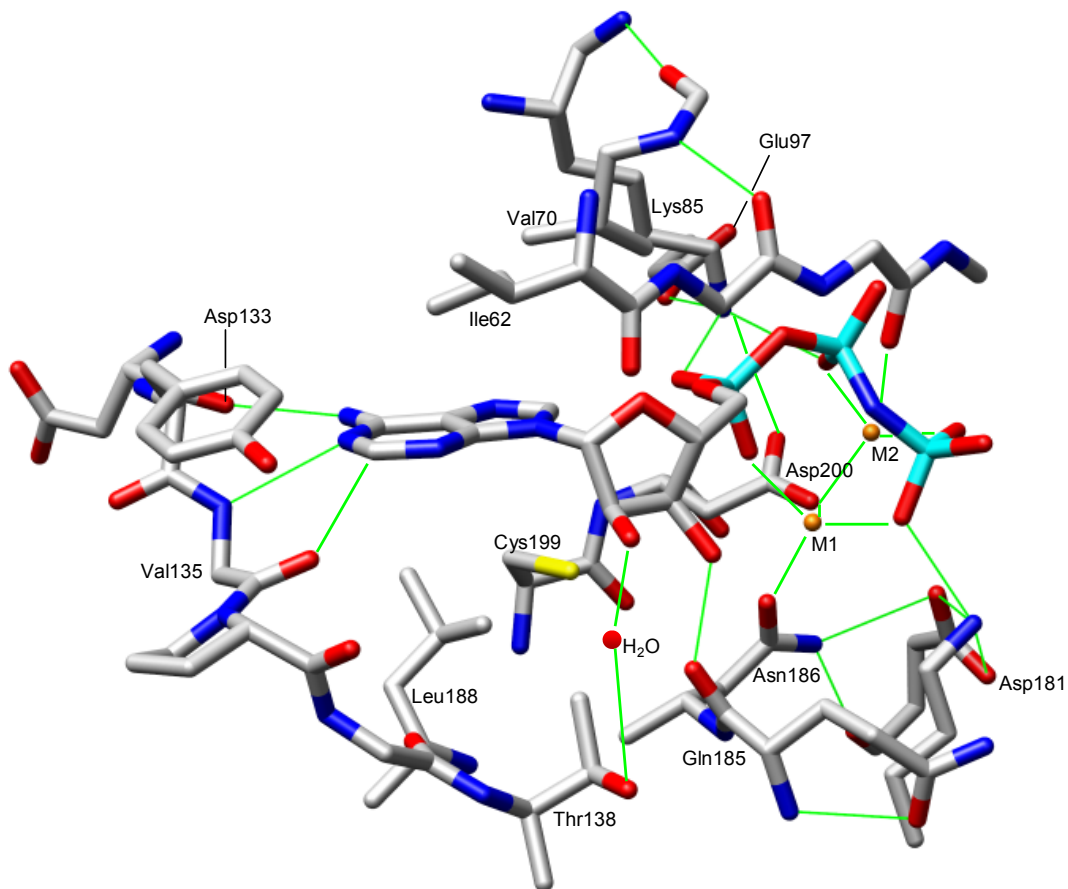
Erstellt mit Chimera<sup>120</sup>; (PDB-code: 1PYX)



## 4.2 Die ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$

Die ATP-Bindungsregion der GSK-3 $\beta$  liegt in einer definierten und stark ausgebuchteten Kavität. Zwei Strukturen sind in der PDB enthalten, welche die GSK-3 $\beta$  in Komplex mit dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon AMP-PNP zeigen (PDB: 1PYX und 1J1B). Die Strukturen zeigen, wie die katalytischen Reste der  $\gamma$ -Phosphat-Transferregion der Bindetasche ein komplexes Interaktionsnetzwerk mit AMP-PNP aufbauen (Abbildung 4-3). Die Bindetasche kann in fünf unterschiedliche Regionen eingeteilt werden, die verschiedene Interaktionen mit dem ATP-Mg<sup>2+</sup>-Komplex eingehen: die Phosphat-Transferregion, der glycine-rich loop, die obere und untere Hinge-Region sowie die hydrophobe Tasche (Abbildung 4-2).

Abbildung 4-3: AMP-PNP in der GSK-3 $\beta$



erstellt mit Chimera<sup>120</sup> (PDB: 1PYX)

Die Aminosäure Lys85 ist zwischen dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat des ATP-Analogon positioniert und bildet eine Salzbrücke mit Glu97. Weiterhin geht es Bindungen mit der Asp200-Seitenkette ein, die das  $Mg^{2+}$ -Kation M2 orientiert, welches zwischen dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat liegt. Asn186 orientiert das zweite Magnesium-Kation M1, das Kontakt zu dem  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Phosphat sowie der Carboxyl-Gruppe von Asp200 herstellt. Die Seitenkette von Asn186 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Backbone-Carbonyl von Asp181 aus. Die Carboxyl-Seitenkette von Asp200 abstrahiert das Proton der Hydroxyl-Gruppe des Substrats Serin oder Threonin und orientiert die Lys85-Seitenkette. Von dieser Seitenkette wird angenommen, dass sie an dem  $\gamma$ -Phosphattransfer von ATP auf die Serin- bzw. Threonin-Seitenkette beteiligt ist. Das Netzwerk der Interaktionen mit dem Nukleotid ist teilweise verantwortlich für die Ausrichtung der N- und C-terminalen Domänen. Asp181 richtet die Seitenkette von Lys183 aus, während Arg180 ebenfalls Bindungen zum präphosphorylierten Serin in der Substratbindetasche eingeht. Diese Gründe sprechen für die enge Koordination des  $\gamma$ -Phosphattransfers mit der Ausrichtung der Kinasedomäne.

Der glycine-rich loop ist ein relativ flexibler Bereich der ATP-Bindetasche, was eine Anpassung der Schleife an das Molekül in der Bindetasche ermöglicht. Die Flexibilität rührt von dem Vorhandensein dreier konservierter Glycin-Reste. Der Adenin-Teil von AMP-PNP geht van-der-Waals-Interaktionen mit den hydrophoben Resten Ile62 und Val70 des glycine-rich loop ein und wird nach unten hin durch Cys199 und Leu188 eingebettet. Die Hinge-Region (Asp133-139) stellt das flexible Bindeglied zwischen der N- und C-terminalen Domäne dar und erlaubt eine gewisse Beweglichkeit der Domänen zueinander. Die Aminosäuren dieser Region bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit der Adenin-Teilstruktur des ATPs über ihre Backbone-Atome. Dieses Muster ist typisch für ATP-Bindetaschen in Proteinkinasen. Am Anfang der Hinge-Region fungiert das Backbone-Carbonyl von Asp133 als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor, während die Aminofunktion des ATPs der Donator ist. Das nachfolgende Tyr134 ist nicht an Wasserstoffbrücken beteiligt. Wichtige Bindungen gehen wiederum von Val135 aus: Das NH der Amidstruktur bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum N-1 des Adenins aus, während die Carbonyl-Funktion eine Wasserstoffbrückenbindung zum C-2 eingeht. Diese Bindung wird häufig nicht als solche angesehen, jedoch findet man in aromatischen Heterozyklen, gerade bei Kinase-Inhibitoren, Proton-Donator-Eigenschaften der CH-

Gruppen.<sup>135,136</sup> Die Hydroxyl-Gruppe von Thr138 ist indirekt über ein verbrückendes Wassermolekül (H<sub>2</sub>O) mit einer Ribose-Hydroxyl-Gruppe des ATPs verbunden. Dieses Bindungsmuster findet man ebenfalls in Strukturen mit kokristallisierten niedermolekularen Inhibitoren. Abschließend lässt sich noch eine Wasserstoffbrückenbindung beschreiben, die zwischen der Carbonyl-Funktion von Gln185 und dem O-3' der Ribose-Partialstruktur besteht.

### 4.3 Alsterpaullon in der ATP-Bindetasche der GSK-3β

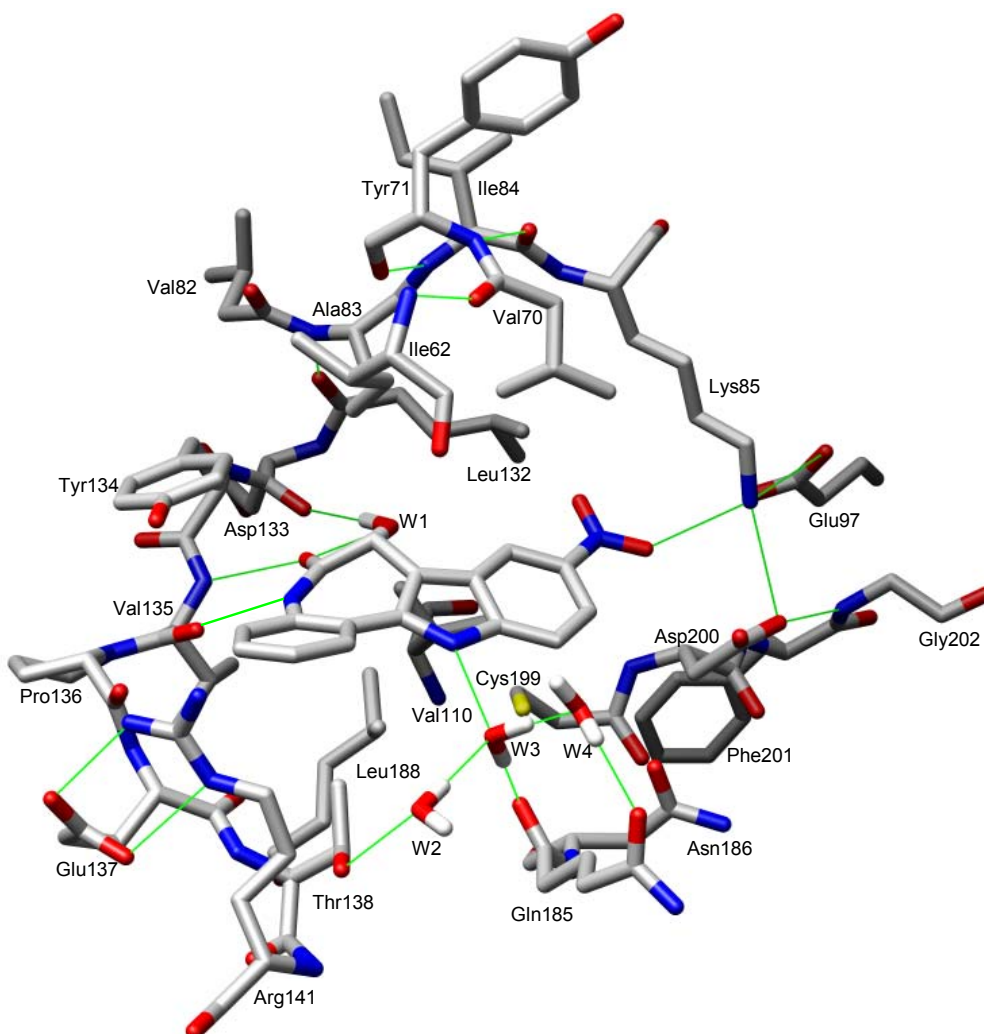
Eine im Jahr 2003 veröffentlichte Publikation gab wertvolle Einblicke in den Bindungsmodus von Alsterpaullon (**1b**) in der ATP-Bindetasche der GSK-3β. Die Röntgenkristallstruktur der GSK-3β mit dem kokristallisierten Alsterpaullon legt dabei die für die Bindung wichtigen Interaktionen offen.<sup>56</sup> Wie auch andere Inhibitoren, bindet Alsterpaullon an die Hinge-Region. Dabei geht es zwei direkte Wasserstoffbrückenbindungen über die Lactam-Struktur zum Backbone des Val135 ein. Eine weitere, über das Wassermolekül W1 vermittelte Wasserstoffbrückenbindung verbindet das Lactam-Carbonyl mit dem Backbone-Carbonyl von Asp133. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung erfolgt von der Nitrogruppe in Position 9 des Alsterpaullons, die als Akzeptor fungiert, zum protonierten Donator Lys85. Die letzte polare Interaktion des Alsterpaullons geht von dem Indol-NH in Position 12 aus. Wiederum werden über Wassermoleküle Interaktionen zur Hydroxylfunktion der Thr138-Seitenkette und der Carbonylfunktion von Gln185 vermittelt.

Insgesamt liegt das tetrazyklische Ringsystem des Alsterpaullons etwas unterhalb der Adenin-Bindungsebene, was durch die Auffaltung der Methylengruppe aus der Ebene des Azepinrings heraus verursacht wird. Die Ringe A und B folgen in einer zur Hinge-Region komplementären Ausrichtung den Aminosäuren Asp133-Tyr134-Val135-Pro136 bis zur Guanidin-Gruppe des Arg141. Die Ringe C und D erstrecken sich in Richtung des Lys85. Asp200 und die Seitenketten von Lys85 und Leu132 umschließen die Nitrofunktion des Alsterpaullons. Die Topographie dieser Verbindung führt zu einer Einbettung in die Bindetasche. Das Ringsystem liegt oberhalb der Aminosäuren Leu188 und Cys199 und unterhalb von Ile62 und Val70. Zu den letztgenannten Aminosäuren werden jedoch keine van-der-Waals-

Wechselwirkungen ausgebildet, wie dies bei anderen Inhibitoren der Fall ist (Abbildung 4-4).<sup>56</sup>

Beim Design von neuen Inhibitoren mit Paullongrundgerüst sind die für die Bindung wichtigen Strukturelemente zu konservieren bzw. durch bioisostere Partialstrukturen zu ersetzen. Unabdingbar ist dabei der Erhalt der Lactam-Struktur der Paullone. Veränderungen an diesem Molekülteil, z.B. Substitution am Lactam-Stickstoff, führen zu einem Wirkungsverlust an GSK-3,<sup>43</sup> da die Wasserstoffbrückenbindungen zu Val135 der Hinge-Region unterbrochen werden. Folglich sollten nur solche Strukturmodifikationen durchgeführt werden, die einen möglichst unveränderten Bindungsmodus in der ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$  gewährleisten.

Abbildung 4-4: Alsterpaullon in der ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$



(grüne Linien indizieren Wasserstoffbrückenbindungen, graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>)  
(PDB: 1Q3W)

## 4.4 Designüberlegungen zu neuen GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren vom Paullontyp

Unter Berücksichtigung der neu gewonnen Informationen über die molekulare Struktur des Alsterpaullon-GSK-3 $\beta$ -Komplexes wurde ein rationales Design von Inhibitoren angestrebt. Welche Substitutionsmuster am Liganden durch die Gegebenheiten in der Bindetasche toleriert würden, ließ sich durch die visuelle Analyse der Bindetasche abschätzen. Zusätzliche Informationen über das Bindungsverhalten potenzieller Inhibitoren sollten über Docking-Experimente herausgefunden werden.

### 4.4.1 Molecular Modelling

Molecular Modelling behandelt die Berechnung, Darstellung und das Bearbeiten von dreidimensionalen Molekülstrukturen. Ausgewählte Methoden sind beispielsweise die Konstruktion von Molekülen, Energieminimierung durch Kraftfeldrechnungen und das Modellieren von Protein-Ligand-Interaktionen mittels Docking von Liganden in die Bindetasche des Targets.

Dreidimensionale Modelle von kleinen Molekülen können auf Basis von Fragmenten erstellt werden, die sich in geeigneten Datenbanken finden. Nach der bloßen Konstruktion eines 3D-Modells eines Moleküls ist eine Geometrieoptimierung notwendig, um energetisch bevorzugte Konformationen zu finden. Dies kann durch die Anwendung von Molekülmechanikmethoden, auch Kraftfeldmethoden genannt, durchgeführt werden, die an empirischen Daten parametrisiert wurden. Diese ermöglichen die Berechnungen von Molekülgeometrien und –energien. Dies ist notwendig, da es sich bei dem konstruierten Modell zufällig um eine energetisch ungünstige, sprich energiereiche Konformation handeln könnte. Das Modell wird relaxiert und durch Optimierung der Bindungslängen sowie der Bindungs- und Torsionswinkel in eine Konformation mit geringerer Energie transformiert. Konformationen mit geringer Energie sind stabiler und gewünscht, da bioaktive Konformationen häufig mit einem geringen Energiegehalt einhergehen. Dabei muss es sich nicht zwangsweise um die Konformation handeln, die den geringsten Energiegehalt besitzt.

Bei der Energieminimierung ist zu beachten, dass es sich bei dem gefundenen Minimum um das nächste lokale und nicht explizit um das globale Minimum handelt. Daraus resultiert, dass die gefundene Konformation mit vorhergesagter minimaler Energie am Ende der Optimierung von der Ausgangsgeometrie abhängt. Verschiedene Startgeometrien können zu verschiedenen minimierten Ergebnissen führen.

Die Berechnungen werden mittels einer Funktion mit adaptierbaren Parametern durchgeführt. Diese beschreiben die Wechselwirkungskräfte, die zwischen Atomen auftreten, wie Bindungsstreckung, Winkeldeformation, Bindungstorsion und nichtkovalente Kräfte. Die Gesamtenergie eines Moleküls ist die Summe aus den Einzeltermen. Grundlage für die Bewegung der Atome zueinander ist das Hooksche Gesetz. Es wird dabei angenommen, dass Atome in Molekülen Kugeln verschiedener Größe gleichen, die durch Federn (die Bindungen) zusammengehalten werden. Winkel und Bindungen in Molekülen haben festgelegte Werte, die jedoch durch van-der-Waals-Kräfte, Bindungsstreckung und Winkeldeformation von der Norm abweichen können. Exemplarisch sei dabei die folgende Gleichung betrachtet, welche die Bindungsstreckung beschreibt:

- $E_{\text{str}} = \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 \cdot K_b \quad (1)$

In Term 1 entspricht  $E_{\text{str}}$  der Kraftkonstante, die die Bindungsstreckung beschreibt,  $b_0$  ist die festgelegte Bindungslänge und  $b$  gibt die tatsächliche Bindungslänge an. Die verschiedenen festgelegten Werte und die jeweiligen Kraftkonstanten bezeichnet man als Kraftfeldparameter. Hauptquelle für die Standardwerte sind große Strukturdatenbanken, wie die PDB.

Je nach Aufgabenstellung stehen verschiedene parametrisierte Kraftfelder zur Verfügung. Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren lassen sich gut mit dem Kraftfeld AMBER berechnen, während sich MM4 für Kohlenwasserstoffe eignet. Daneben existieren sog. „all-around force fields“, wie das Tripos Kraftfeld,<sup>137</sup> was auf vielfältige Problemstellungen angewendet werden kann.<sup>138,139</sup>

#### 4.4.1.1 Molekulares Docking mit FlexX

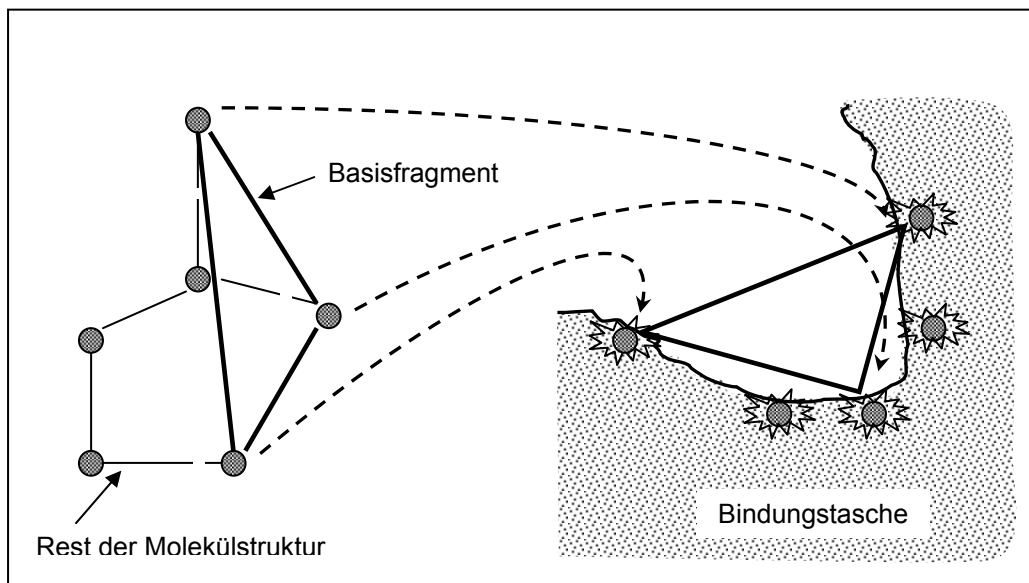
Für das Einpassen eines Moleküls in das aktive Zentrum eines Proteins (Docking) kann beispielsweise das Softwarepaket FlexX verwendet werden. Der Docking-Algorithmus von FlexX berücksichtigt die konformationelle Flexibilität des Liganden, wohingegen der Rezeptor als nicht-flexibel behandelt wird. Dabei benutzt FlexX einen inkrementellen Konstruktionsalgorithmus, der sich in drei Phasen einteilen lässt:

- Auswahl des Basisfragments
- Platzierung des Basisfragments
- Rekonstruktion des Ligands

In der ersten Phase wird der Ligand in Fragmente geteilt und ein Basisfragment wird ausgewählt. Die Kriterien Platzierbarkeit und Spezifität charakterisieren ein gutes Basisfragment. Platzierbarkeit steht dafür, dass möglichst viele Interaktionen eingegangen werden können und dass die Anzahl der möglichen Konformationen möglichst gering ist, so dass der Algorithmus das Fragment platzieren kann. Die Spezifität drückt aus, dass das Basisfragment spezifisch genug sein muss, um eine vom Rest des Liganden unabhängige Platzierung zu ermöglichen.

Das Basisfragment wird in der zweiten Phase unabhängig von dem Rest der Liganden in der Bindetasche platziert. Die Intention des Algorithmus ist es, den Ligand so zu positionieren, dass möglichst viele Interaktionspunkte zwischen Ligand und Protein gefunden werden. In der Hauptsache sollen Interaktionstripel zwischen Ligand und Protein eingegangen werden. Eine Transformation des Liganden in die Bindeasche wird durch Überlappung des Interaktionszentrendreiecks des Liganden auf das entsprechende des Proteins erreicht (Abbildung 4-5).

Abbildung 4-5: Platzierung des Basisfragments



modifiziert nach Rarey<sup>140</sup>

In der dritten Phase wird der Ligand inkrementell rekonstruiert. Die verbliebenen Fragmente werden den alternativen Platzierungsmöglichkeiten des Basisfragments zugeordnet. Jede Iteration vollführt folgende Schritte für die möglichen Lösungen: Die Addition des nächsten Fragments in allen möglichen Konformationen, die Suche nach neuen Interaktionen, die Optimierung der Position des partiellen Liganden sowie die Auswahl und das Clustern der gefundenen Lösungen. Dabei werden Fragmente bevorzugt und als erste positioniert, die Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken eingehen können, da diese Interaktionen geometrisch präziser sind als die hydrophoben Wechselwirkungen.<sup>140,141</sup>

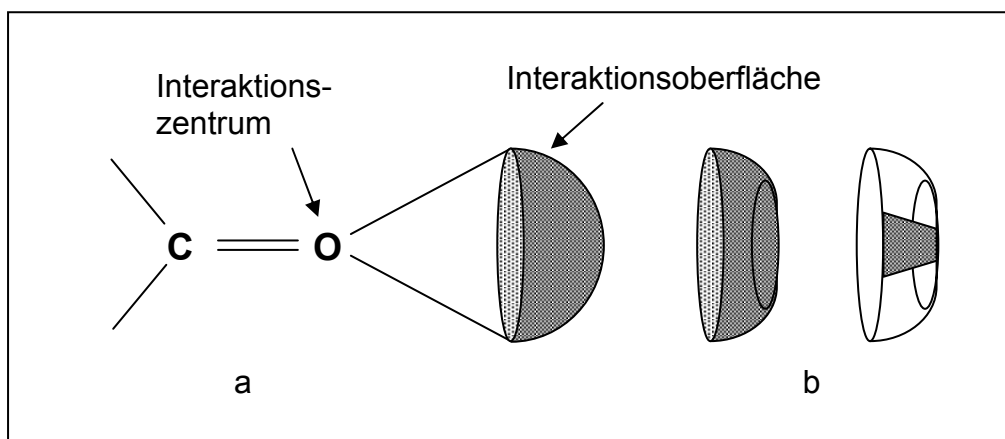
Die konformationelle Flexibilität des Liganden wird durch eine Zusammenstellung von diskreten Konformationen mit geringer Energie approximiert. Jeder azyklischen Bindung wird ein Set von bevorzugten Torsionswinkeln zugeordnet. Ausnahmen hiervon bilden Bindungen, die zu Methyl-Gruppen oder zu planaren Amino-Gruppen führen. Diese verbleiben in der initialen Konformation. Für jedes Ringsystem werden verschiedene Konformationen geringer Energie berechnet.

Die Bewertung von verschiedenen Protein-Ligand-Wechselwirkungen werden genutzt, um den Ligand in der Bindetasche zu positionieren. Dabei unterscheidet FlexX zwischen verschiedenen Interaktionstypen. Die dabei auftretenden Interaktionen können als geometrisch restriktiv oder weniger restriktiv klassifiziert



werden. Unter die erste Kategorie fallen Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken, während hydrophobe Wechselwirkungen der zweiten Gruppierung zugehörig sind. Da die meisten restriktiven Wechselwirkungen eine definierte Interaktionsdistanz aufweisen, arbeitet FlexX mit dem folgenden Modell: Jeder interagierenden Gruppe des Liganden und des Proteins wird ein Wechselwirkungstyp und eine Wechselwirkungsgeometrie zugeordnet. Die Geometrie beinhaltet ein Interaktionszentrum und eine darum zentrierte sphärische Interaktionsoberfläche (Abbildung 4-6). Letztere kann kegelförmig, teilkegelförmig oder ein sphärisches Rechteck sein, je nachdem welche Interaktion berechnet wird (Abbildung 4-7).

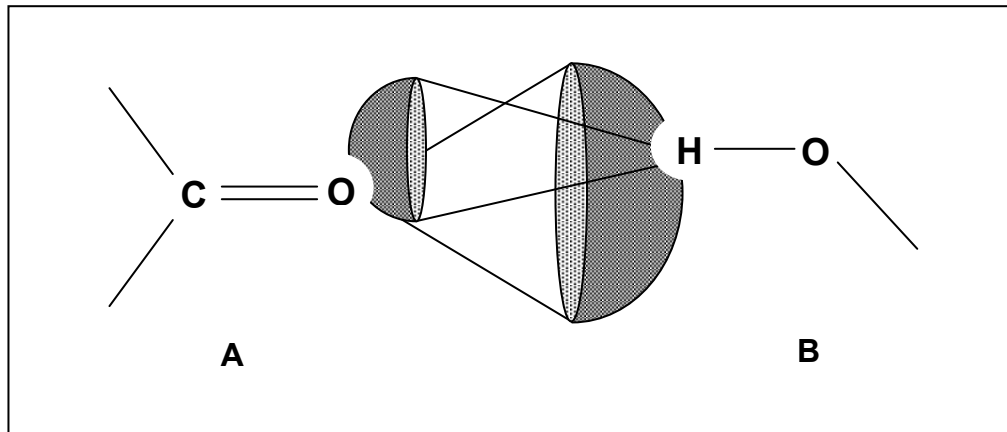
Abbildung 4-6: Interaktionszentrum und –oberflächen



modifiziert nach Rarey<sup>140</sup>

Eine Interaktion zweier Gruppen findet statt (Abbildung 4-6, A und B), wenn die Interaktionstypen kompatibel sind und das Interaktionszentrum der jeweiligen Gruppe auf der Interaktionsoberfläche der anderen Gruppe liegt (Abbildung 4-6).

Abbildung 4-7: Wechselwirkung zwischen zwei Gruppen



modifiziert nach Rarey<sup>140</sup>

Das Ranking der gefundenen Dockinglösungen wird nach der folgenden Scoring-Funktion berechnet.<sup>140</sup> Dabei wird die freie Bindungsenergie  $\Delta G$  als Summe lokaler Wechselwirkungen (basierend auf physikalischen Näherungen) modelliert.

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} * N_{\text{rot}} \quad (1)$$

$$+ \Delta G_{hb} \quad \sum_{\text{neutral H-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \quad (2)$$

$$+ \Delta G_{io} \quad \sum_{\text{ionic interaction}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \quad (3)$$

$$+ \Delta G_{ar} \quad \sum_{\text{aromatic interaction}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \quad (4)$$

$$+ \Delta G_{lipo} \quad \sum_{\text{lipophilic contacts}} f^*(\Delta R) \quad (5)$$

Die Funktion kann in drei verschiedene Teile differenziert werden. Der erste Teil (1) beinhaltet einen festen Term ( $\Delta G_0$ ) und einen Term ( $\Delta G_{\text{rot}} * N_{\text{rot}}$ ), der den Entropieverlust bei der Bindung des Liganden berücksichtigt.  $N_{\text{rot}}$  gibt die Anzahl der frei rotierbaren Bindungen an, die im Protein-Ligand-Komplex immobilisiert werden. Der zweite Teil (2 – 4) beschreibt den Beitrag aus den verschiedenen Interaktionen: Wasserstoffbrückenbindungen (2), Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zu geladenen Interaktionszentren (3) und aromatische Interaktionen (4). Jeder dieser Terme hat einen konstanten Beitrag pro Interaktion ( $\Delta G_x$ ), der mit einer Straffunktion  $f(\Delta R, \Delta \alpha)$  multipliziert wird. Diese Funktion bestraft Abweichungen von der idealen Geometrie und ist abhängig vom zuvor beschriebenen Typ der Interaktion. Der dritte Teil berücksichtigt Atom-Atom-Kontakte zwischen Ligand und Protein wie z. B. hydrophobe Wechselwirkungen und verbotenen, zu nahen Kontakten (clashes).

#### 4.4.1.2 Docking von Azapaulonen in die Bindetasche der GSK-3 $\beta$

Zunächst wurden die weiter unten besprochenen Zielstrukturen mit Hilfe des Programms SYBYL 7.0<sup>142</sup> konstruiert. Dabei wird zunächst aus Fragmenten eine Basisstruktur erstellt, die nachfolgend auf die korrekten Atom- und Bindungstypen hin überprüft wird. Anschließend wird eine Geometrieoptimierung mittels Kraftfeldrechnung vorgenommen. Zum Einsatz kam das Tripos-Kraftfeld<sup>137</sup> mit folgenden Einstellungen:

- Iterationen: 1000
- RMS-Gradient: 0,05 kcal/(mol\*Å)
- Ladungen: Keine

Nach der ersten Optimierung wurden für alle Strukturen die Partialladungen mit Hilfe des Programms MOPAC<sup>143</sup> nach der AM1-Methode berechnet. Das Tripos force field wurde für eine weitere Energieminimierung mit folgenden Parametern eingesetzt:

- Iterationen: 1000
- RMS-Gradient: 0,05 kcal/(mol\*Å)
- Ladungen: MOPAC-Ladungen

Die energieminierten Strukturen wurden in einer Sybyl-Datenbank abgelegt und somit für das anschließende Docking verfügbar gemacht.

Bevor Liganden mit Hilfe von FlexX in eine Bindetasche gedockt werden können, muss diese zunächst definiert werden. Dazu bedient sich FlexX eines receptor description files (rdf). Diese Datei enthält Daten, die die physikochemischen Eigenschaften der Bindetasche beschreiben: Atomtypen und –bindungen, Formalladungen, Interaktionsgruppen und Protonierung sind Inhalte des rdfs, ebenso die Definition der Bindetasche über die Aminosäuren. Aufgrund der gegebenen Struktur des kokristallisierten Alsterpaullons in der Bindetasche konnte die nötige räumliche Ausdehnung der Bindetasche für den rdf bestimmt werden. Innerhalb eines Abstands von 6,5 Å um jedes Atom des Liganden Alsterpaullon waren die für die Interaktionen wichtigen Aminosäuren positioniert, so dass diese Distanz um Alsterpaullon herum für den rdf gewählt wurde. Die zuvor in einer Datenbank abgelegten Strukturen konnten nun gedockt werden. Die jeweils gefundenen Ligandplatzierungen, auch Docking-Lösungen genannt, wurden entsprechend der Scoring-Funktion bewertet und nach bestem Score absteigend sortiert (Tabelle 11-13, Abschnitt 11.3). 30 verschiedene Lösungen wurden für jede gedockte Struktur erzeugt. Die in Tabelle 11-13 (Abschnitt 11.3) dargelegten Werte beziehen sich auf die bestbewertete Lösung, wobei die ersten 10 Lösungen mittels visueller Inspektion auf ein noch besseres Fitting hin untersucht wurden. Visuell ließen sich jedoch keine merklichen Verbesserungen der Lösungen 2-10 im Vergleich zur besten Lösung feststellen.

Durch Analyse der Röntgenkristallstruktur des kokristallisierten Alsterpaullons in der Bindetasche der GSK-3 $\beta$  erklären sich die für die Bindungen wichtigen Wechselwirkungen des Liganden mit den relevanten Aminosäuren. Dabei finden sich Interaktionen, die durch Wassermoleküle vermittelt werden wie die Verbrückung zum Asp133 oder zum Thr138 (Abbildung 4-4). Diese Wassermoleküle können durch die Partikelfunktion<sup>144</sup> in FlexX (eine Funktion, die die Integration von diskreten Wassermolekülen in den inkrementellen Konstruktionsalgorithmus beschreibt) nicht korrekt ausgerichtet werden. Aus diesem Grund müssen die Wassermoleküle im rdf der Bindetasche manuell zugeordnet und positioniert werden. Diese Wassermoleküle können jedoch bei geeigneter Substitution eines Liganden aus der Bindetasche verdrängt werden und neue Interaktionen zur Bindetasche entstehen. Dieser Möglichkeit muss beim Docking genüge getan werden, indem die

Wassermoleküle ganz oder teilweise aus der Bindetasche entfernt werden. Aus diesem Grund sind mit den entworfenen Substanzen drei Dockings durchgeführt worden: Unter Erhalt sowie unter Entfernung aller relevanter Wassermoleküle (W1-W4, Abbildung 4-4), und nach Entfernung der Wassermoleküle aus der Ribosetasche (W2-W4, Abbildung 4-4). Die Ergebnisse der einzelnen Liganden in den verschiedenen Dockings sind in Tabelle 11-13 (Abschnitt 11.3) im Experimentellen Teil dieser Arbeit zusammengefasst.

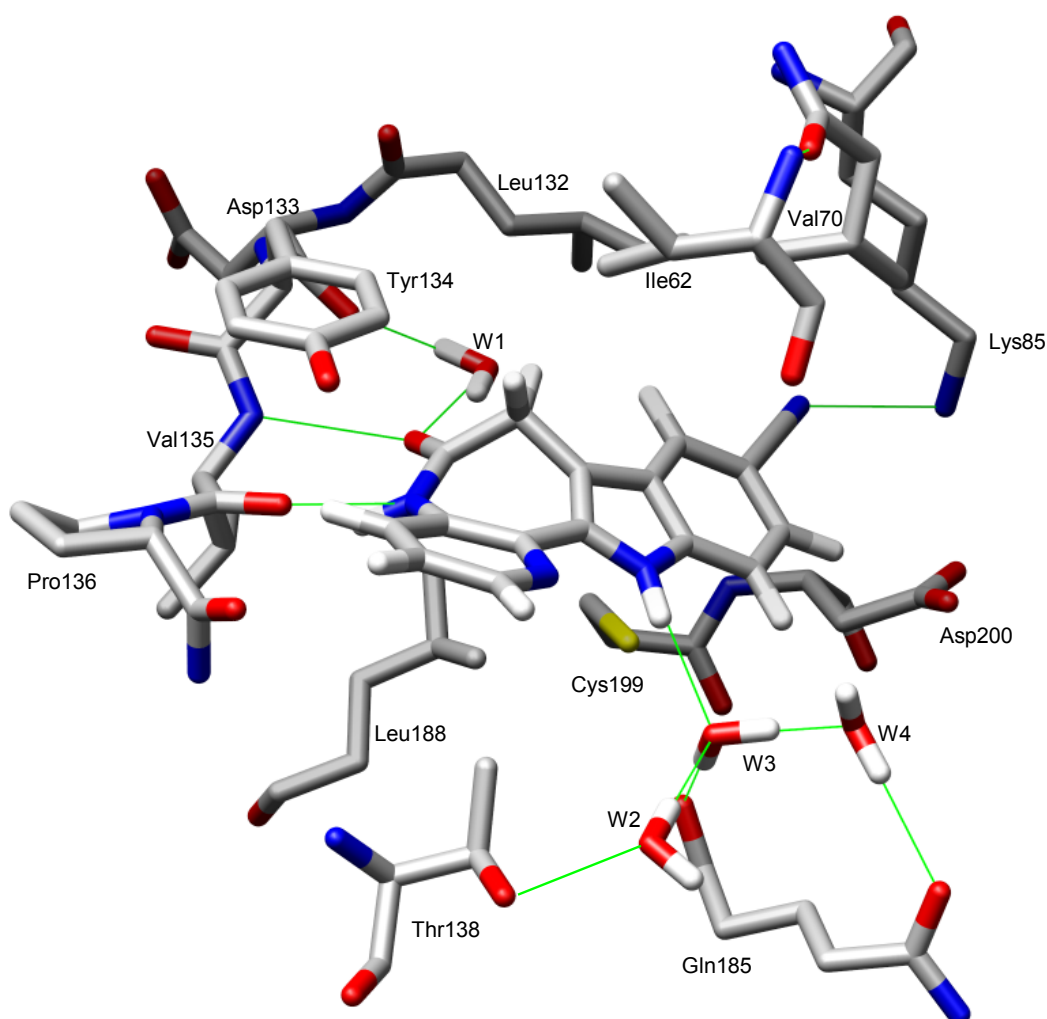
#### **4.4.1.3 Generelle Anmerkungen zu den Ergebnissen des Dockings**

Die konstruierten Paullon-Derivate, die in die GSK-3-Bindetasche gedockt worden sind, ähneln sich sehr in ihrer Struktur und daraus entstehenden Topographie. Ein Großteil der Verbindungen unterscheidet sich nur in einem Substituenten, was dazu führt, dass die verschiedenen Liganden eine untereinander sehr ähnliche Bindungsorientierung haben. Daraus ergeben sich für einige der gedockten Verbindungen nur geringfügige Unterschiede im FlexX-Score (vgl. Tabelle 11-13, Abschnitt 11-3). An dieser Stelle soll explizit darauf hingewiesen werden, dass man aufgrund von erhaltenen Docking-Scores eines Liganden seine tatsächliche Affinität zu dem Target bis dato nicht vorhersagen kann. Für die Ligand-Rezeptor-Bindung entscheidende Parameter wie Solvatisierung/Desolvatisierung von Ligand und Rezeptor sowie weitere entropische Beiträge werden nicht berücksichtigt. Des Weiteren vernachlässigen die meisten Docking-Programme die Flexibilität der Proteinstruktur sowie energetische Unterschiede zwischen der minimierten und der aktiven Ligandkonformation.<sup>145</sup> Die erhaltenen Docking-Lösungen geben lediglich Anhaltspunkte für mögliche Interaktionen und illustrieren mögliche Bindungsmodi.

#### 4.4.2 Design von 1-Azapauillon

Docking von 1-Azakenpaillon in die Bindetasche der GSK-3 $\beta$  zeigte sehr ähnliches Bindungsverhalten des Inhibitors im Vergleich zu Alsterpaillon. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Grundgerüst des 1-Azakenpaillons nur marginale Unterschiede zu dem des Alsterpaillons aufweist. Des Weiteren sieht der Docking-Algorithmus von FlexX das tetrazyklische Ringsystem der Paillone als Basisfragment an, das nicht weiter in Partialstrukturen zerlegt wird und als solches in der Bindetasche positioniert wird. Dieses führt zu sehr ähnlichen Orientierungen des Paillon-Grundgerüsts innerhalb der verschiedenen Derivate des Paillon-Grundgerüsts. Das Einführen des Pyridin-Stickstoffs in die Position 1 des Ringsystems hat somit keine Auswirkung auf den generellen Bindungsmodus. Gleiches gilt für die weiter unten beschriebenen 2-Aza- und 12-Oxapaillone. Von dem Entwurf eines etwaigen 1-Azaalsterpaillons mit 9-Nitro-Substitution wurde aus zwei Gründen abgesehen. Im Alsterpaillon bedingte die Nitro-Substitution neben der sehr guten Potenz eine schlechte Wasserlöslichkeit der Verbindung (2  $\mu\text{g/ml}$ ).<sup>107</sup> Zudem sind Arzneistoffe mit Nitro-Gruppen unter pharmakologischen Gesichtspunkten kritisch zu bewerten, da sie hepatotoxisch sein können und ihre Metaboliten (z.B. durch Reduktion entstandene Nitrosoverbindungen) karzinogenes Potenzial aufweisen.<sup>146</sup> Andererseits war es wünschenswert, die Interaktion mit Lys85 zu konservieren. Eine in diesem Zusammenhang bioisostere Substitution der Nitro-Funktion stellte das Einführen der Carbonitril-Funktion dar. Der sp-hybridisierte Stickstoff fungiert als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor und dieser liegt nach Analyse des Dockings mit einem Abstand von 3,127 Å (N–H $\cdots$ N) in dem Bereich (2,5 – 3,2 Å),<sup>147</sup> in dem sich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Abbildung 4-8).

**Abbildung 4-8:**      **2c** (vgl. Seite 75) in der ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$



(grüne Linien indizieren Wasserstoffbrückenbindungen, gedockt mit FlexX,<sup>140</sup> graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>) (strukturelle Basis des Proteins: PDB: 1Q3W)

Da sich Elektronen-ziehende Substitution von Paullonen in Position 9 als günstig erwiesen hat,<sup>148</sup> wurden ebensolche Derivate entworfen und anschließend in die Bindetasche der GSK-3 $\beta$  gedockt. Relativ zum FlexX-Score von 1-Azakenpaullon zeigten die 1-Azapaulone mit Substitution durch  $-CF_3$ ,  $-I$  und  $-CN$  in Position 9 noch bessere Werte. Ähnliche FlexX-Scores im Vergleich mit 1-Azakenpaullon weisen die Substituenten 9-Cl und 9-F auf. In etwa demselben Bereich liegen die Werte für die Elektronen-schiebenden Substituenten 9-OH, 9-Me und 9-OMe. Dieses Substitutionsmuster wird von den Gegebenheiten der Bindetasche toleriert, jedoch liegen die FlexX-Scores unter denen der stark Elektronen-ziehenden Substituenten. Voluminöse Reste mit einem +I-Effekt (z.B. 9-*tert*-Butyl) werden weniger gut toleriert, was sich wiederum im Vergleich zu 1-Azakenpaullon in einem schlechteren FlexX-

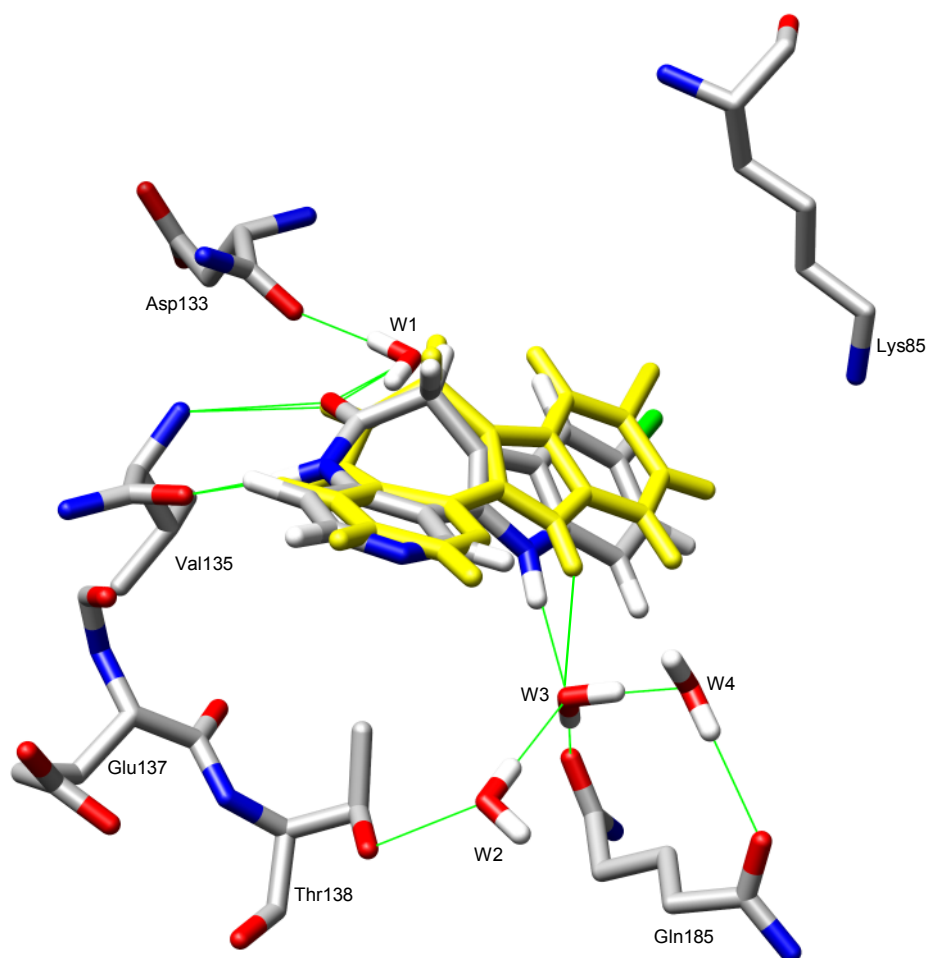
Score ausdrückt. Dies ist konsistent mit der visuellen Inspektion der Bindetasche. Der hydrophobe Rest ist sterisch zu anspruchsvoll für den ihm zur Verfügung stehenden Raum, deshalb wurde vom Design weiterer derartiger Substituenten Abstand genommen. Ein weniger gutes Ergebnis lieferte ebenfalls die di-Chlor-Substitution in den Positionen 8 und 10. Sterische Hinderungen im hinteren Bereich der Bindetasche und elektrostatische Abstoßung zwischen 10-Cl und Asp200 können dafür als Erklärung in Betracht gezogen werden. Neben 9-monosubstituierten Derivaten sind zwei Verbindungen entworfen worden, die zusätzliche Substituenten in der Position 11 tragen. Es handelt sich dabei um ein 9,11-di-Fluor substituiertes Derivat **2l** und eine Verbindung, die neben der 9-Carbonitril-Funktion einen Iod-Substituenten in Position 11 trägt (**2m**). Während sich die erstere Verbindung, nach Beurteilung durch FlexX, sehr gut in die Bindetasche fügt, weist die zweite, trotz der vorteilhaften 9-CN-Gruppe, einen schlechteren FlexX-Score auf. Dies ist begründbar mit dem voluminösen Iod-Substituent, der vor allem beim Docking unter Berücksichtigung aller Wassermoleküle zu groß und hydrophob für die Umgebung ist (Tabelle 11-13).

#### 4.4.3 Design von 2-Azapauillonon

Neben der Derivatisierung durch verschiedene Substitutionen am Paullon-Grundgerüst sollten weitere Inhibitoren entworfen werden, bei denen sich die Modifikation nicht nur auf unterschiedliche Substituenten beschränken sollte, sondern die am heterozyklischen Grundkörper verändert werden sollten. Dabei galt es zu beachten, dass die Orientierung in der Bindetasche nicht nachteilig beeinflusst, aber trotzdem ein möglichst GSK-3-selektiver Inhibitor erzeugt werden sollte. Durch Verschieben des Pyridin-Stickstoffs aus Position 1 in Position 2 sollte die Bindungsorientierung weitgehend erhalten bleiben, bei einer gleichzeitigen geringen Veränderung der elektronischen Eigenschaften im Ring A des Paullon-Grundgerüsts. Docking der entsprechenden Derivate zeigte ein den 1-Azapauillonon sehr ähnliches Bindungsmuster. Die dabei erhaltenen FlexX-Scores sind schlechter für die jeweiligen 2-Azapauillone, als für die entsprechenden 1-Azaanaloge, wobei die unterschiedlichen Derivate sehr ähnliche Ausrichtung zeigen (Abbildung 4-9).



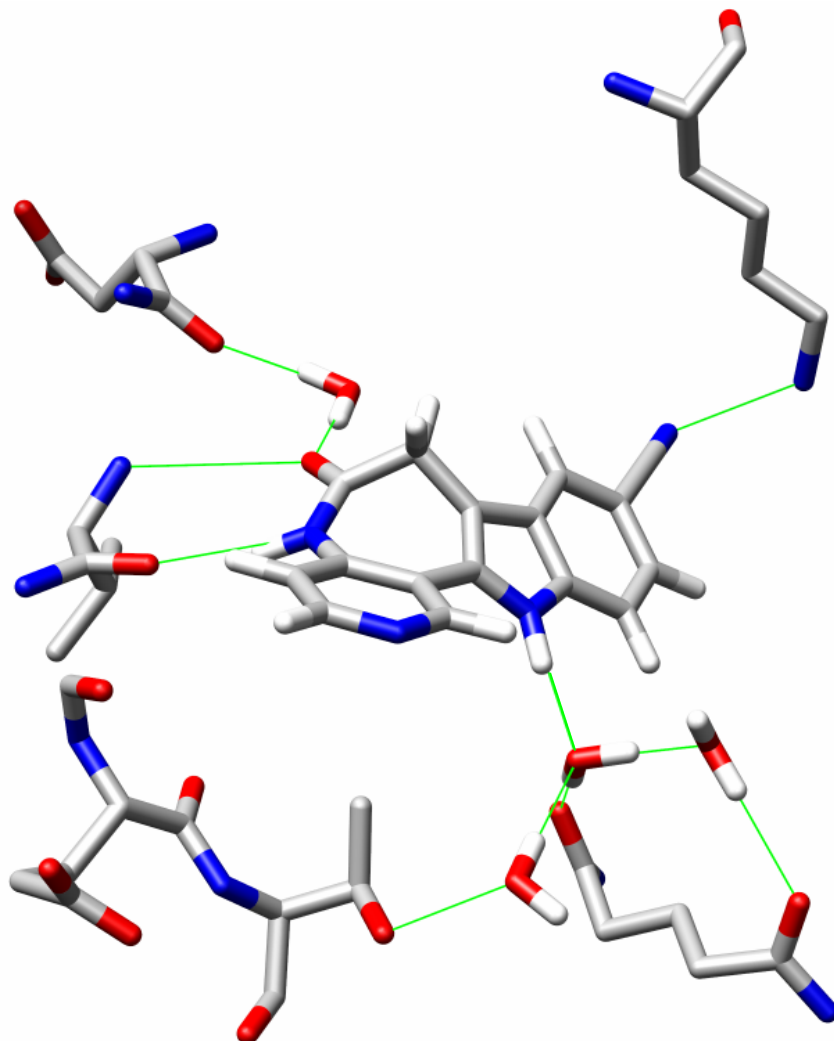
Abbildung 4-9: 1-Azakenpaullon (**2a**) (*gelb*) mit 2-Azakenpaullon (**3a**) (*nach Atomtyp gefärbt*) in der GSK-3 $\beta$  überlagert.



(grüne Linien indizieren Wasserstoffbrückenbindungen, gedockt mit FlexX,<sup>140</sup> graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>) (strukturelle Basis des Proteins: PDB: 1Q3W)

Die Bindungsorientierung der 2-Azapaullone erlaubt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren der Ribose-Tasche. Dabei bildet sich ein ähnliches Bindungsmuster aus, wie es in der Röntgenkristallstruktur des Alsterpaullons zu beobachten war. Die NH-Funktion der Indolteilstruktur von **3c** fungiert als Wasserstoffbrückenbindungs-Donator und wird über das Wassermolekül W3 mit den Aminosäuren Thr138 und Gln185 verbrückt. Die Carbonitril-Gruppe in Position 9 interagiert mit Lys85 (Abbildung 4-10).

**Abbildung 4-10:** Das Indol-NH von **3c** fungiert in der GSK-3 $\beta$ -Bindetasche als Wasserstoffbrückenbindungs-Donator



(grüne Linien indizieren Wasserstoffbrückenbindungen, gedockt mit FlexX,<sup>140</sup> graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>) (strukturelle Basis des Proteins: PDB: 1Q3W)

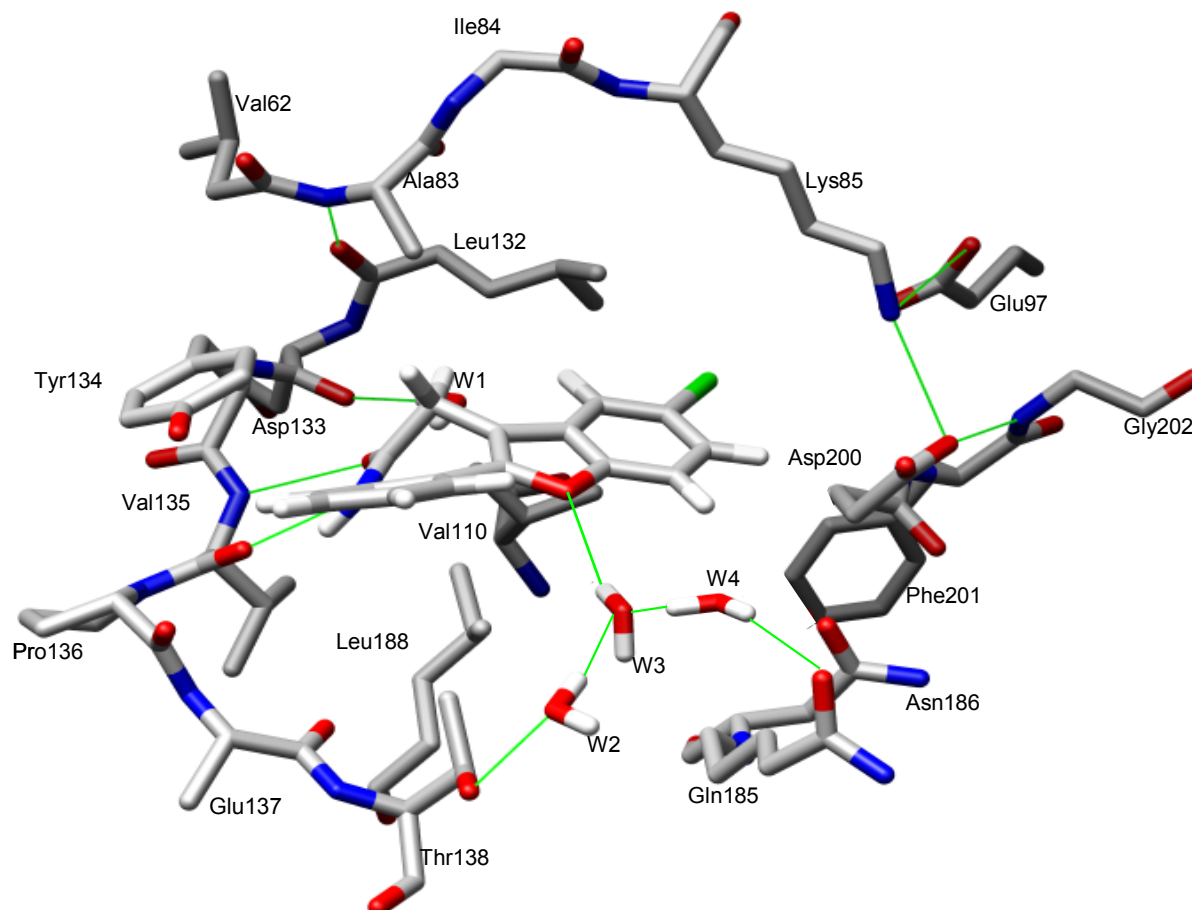
#### 4.4.4 Design von 12-Oxapauillonon

Als weitere Möglichkeit der Veränderung des heterozyklischen Grundkörpers bot sich die Veränderung der Indolteilstruktur an. Das Indol fungiert als Wasserstoffbrückenbindungs-Donator, wie aus der Röntgenkristallstruktur des Alsterpauillons zu entnehmen ist. Das ähnliche Bindungsmuster, das die Docking-Lösungen der 1- und 2-Azapauillone indizieren, spricht für die gleiche Funktion des Indols in diesen Derivaten. Der Austausch des Indol-NH durch Sauerstoff würde

bedeuten, dass anstatt eines Donators ein Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor eingeführt würde. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Wassermoleküle der Ribose-Tasche eine andere Ausrichtung einnehmen können, könnte sich ein Cluster von Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, in dem der Sauerstoff der Benzofuran-Teilstruktur die Protonen der Wassermoleküle akzeptiert (Abbildung 4-11). Zwei verschiedene Derivate wurden modelliert und gedockt, dabei handelt es sich um ein in Position 9 unsubstituiertes Derivat und ein Analogon zum Kenpaullon, das in eben dieser Position einen Brom-Substituenten trägt. Die Orientierung des 12-Oxakenpaullons entspricht wiederum der der anderen Paullonanaloga, da die Molekültopographie nicht bedeutend geändert wurde. Die errechneten FlexX-Scores sind schlechter als die Werte, die für die entsprechend substituierten 1- und 2-Azapaulone ermittelt wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Wassermoleküle der Ribose-Tasche nicht explizit auf die veränderten Gegebenheiten hin modifiziert wurden. Diese waren bei dem Docking noch auf die Umgebung des als Donator fungierenden Indol-NH ausgerichtet. So wurden die beschriebenen polaren Interaktionen nicht ausreichend bei der Berechnung der FlexX-Scores berücksichtigt. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse der verschiedenen Dockings, so schneiden die 12-Oxapaulone auch bei fehlenden Wassermolekülen in der Ribose-Tasche nicht besser als die anderen Paullone ab. Es ergibt sich auch dabei ein Ranking, das die entsprechend gleich substituierten 1-Azapaulone vor den 2-Azaanaloga und diese wiederum vor den 12-Oxapaulonen sieht (vgl. Tabelle 11-13, Abschnitt 11.3).

Obwohl die FlexX-Scores sowohl für 2-Azapaulone als auch für 12-Oxapaulone jeweils schlechter ausfielen als entsprechende Scores für 1-Azapaulone, ließen sich doch alle 3 Ringsysteme sehr gut in die ATP-Bindetasche einpassen. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nur 1-Azapaulone, sondern auch die ganz neuen heterozyklischen Ringsysteme der 2-Aza- und der 12-Oxapaulone synthetisiert.

**Abbildung 4-11:** Der Sauerstoff der Benzofuran-Partialstruktur des 12-Oxapauillons fungiert in der GSK-3 $\beta$ -Bindetasche als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor.



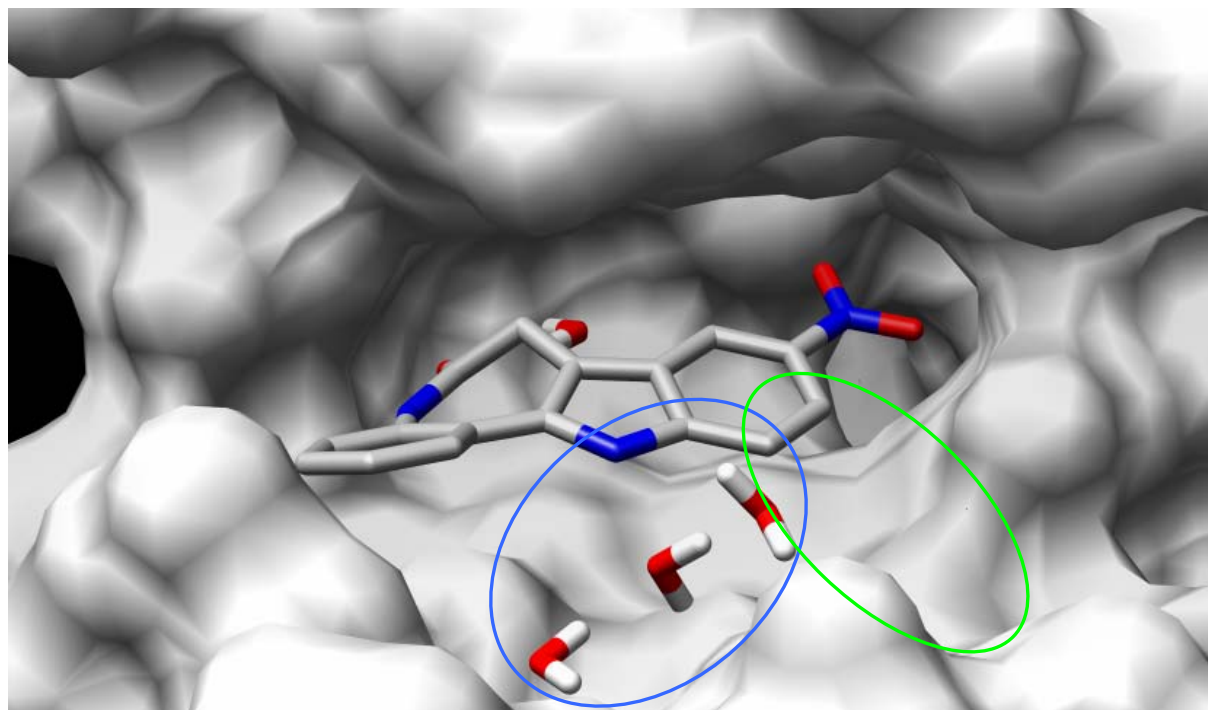
(grüne Linien indizieren Wasserstoffbrückenbindungen, gedockt mit FlexX,<sup>140</sup> graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>) (strukturelle Basis des Proteins: PDB: 1Q3W)

#### 4.4.5 Design von Paullonen mit Substitution in weiteren Positionen

Durch die Analyse der Röntgenkristallstruktur der GSK-3 $\beta$  mit dem kokristallisierten Liganden Alsterpauillon offenbarten sich weitere Bereiche der Bindetasche, die sich für eine geeignete Substitution am Paullongrundgerüst anboten. Gerade im Bereich der zum Lösungsmittel zugewandten Seite ergeben sich Möglichkeiten für die Substitution in Position 11 und 12. Substituenten in Position 11 könnten aus der Bindetasche in eine Region hinaus ragen, die in Abbildung 4-12 mit einer grünen Ellipse gekennzeichnet ist. Durch das Einführen eines Rests in Position 12 könnten

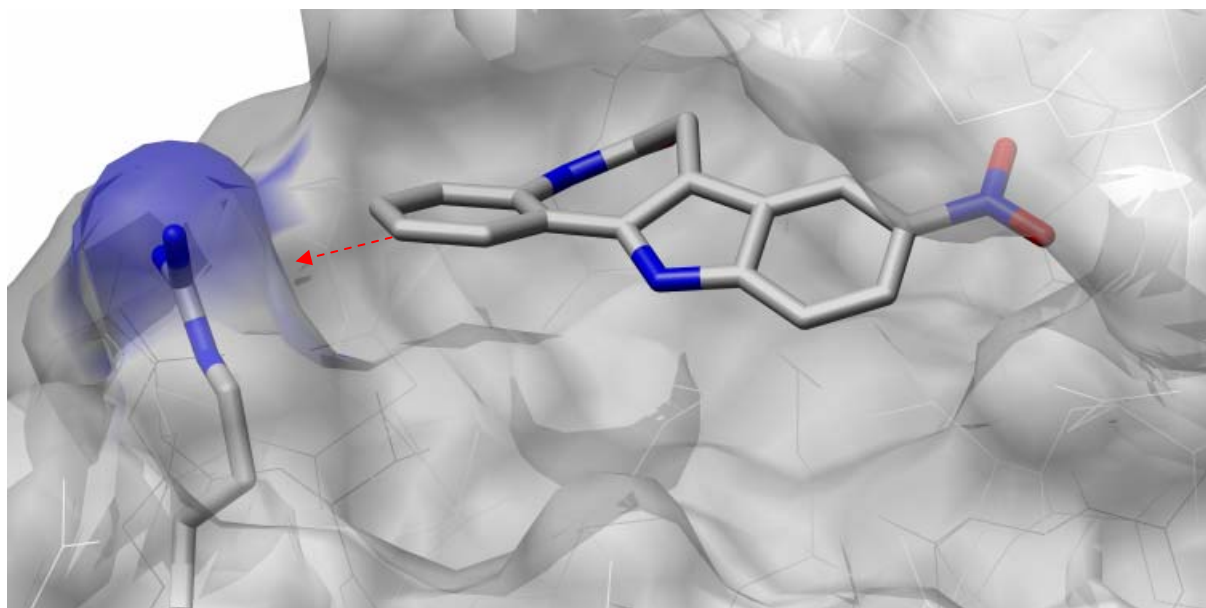
die Wassermoleküle (blaue Ellipse, Abbildung 4-12) verdrängt werden und der Substituent könnte seinerseits Interaktionen zu den Aminosäuren dieses Bereichs eingehen. In Position 2 des tetrazyklischen Ringsystems könnte eine Substitution mit einem Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor erfolgen, um Wechselwirkungen zu Arg141 zu erzeugen (Abbildung 4-13). Denkbar wären hier eine Carbonitril-Funktion und die Substitution mit Alkoxy-Resten.<sup>149</sup> Eine Steigerung der Potenz ließe sich auch durch Einführen von Alkylresten erreichen, die zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor-Funktion aufweisen. Derartig substituierte Paullone sind bekannt, beispielsweise das in Abschnitt 2.3.6 erwähnte 2-Cyanoethylalsterpaullon (**1c**).<sup>106</sup>

Abbildung 4-12: Bereiche, die durch Substitution der Positionen 11 und 12 genutzt werden könnten



(grüne Ellipse bzw. blaue Ellipse indiziert Bereiche, die durch Substitution in Pos. 11 bzw. 12 erschlossen werden können, graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>) (PDB: 1Q3W)

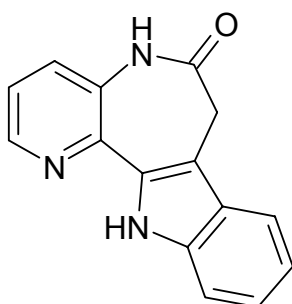
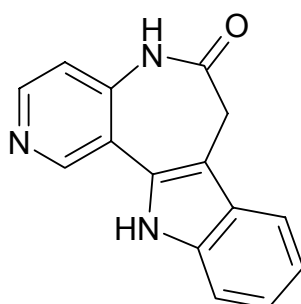
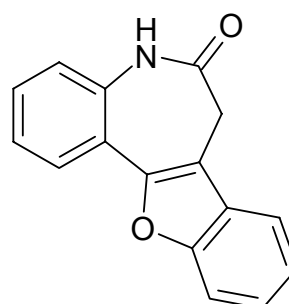
Abbildung 4-13: Wechselwirkungsmöglichkeit zu Arg141 durch Substitution in Position 2



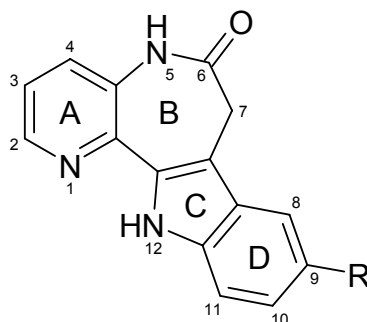
(roter Pfeil indiziert mögliche Interaktionen, graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>) (PDB: 1Q3W)

## 5. Synthese

Aus den vorangegangenen Überlegungen zum rationalen Design von neuen Inhibitoren ergaben sich verschiedene Abwandlungen des heterozyklischen Grundgerüsts der Paullone, sowie die geeignete Substitution dieser Derivate. Letzteres wurde zunächst an dem literaturbekannten Ringsystem 7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2**) der 1-Azapauillone durchgeführt. Anschließend folgten die nachstehenden literaturunbekannten heterozyklischen Vertreter: das Ringsystem 7,12-Dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**3**) der 2-Azapauillone und das Ringsystem 5,7-Dihydro-6*H*-[1]benzofuro[3,2-*d*]benzazepin-6-on (**4**) der 12-Oxapauillone. Für diese rational entworfenen Derivate wurden neue Synthesestrategien entwickelt.

**2****3****4**

## 5.1 Synthese der in Position 9 substituierten 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one



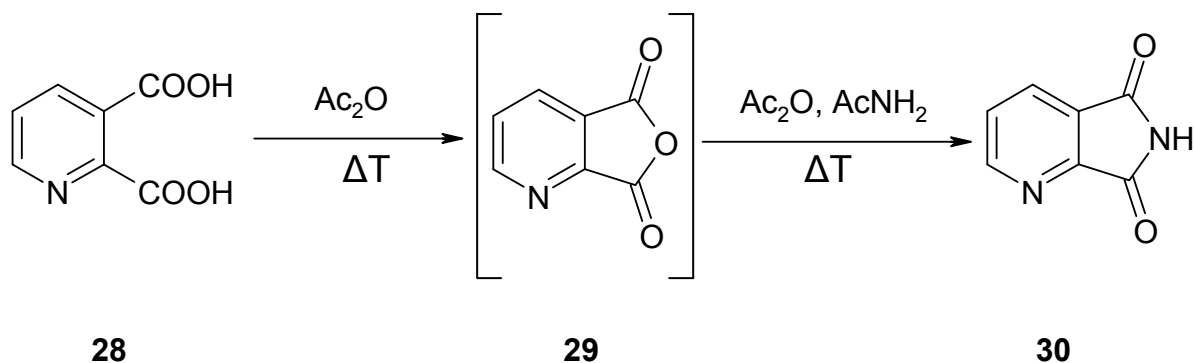
2

Die Synthese des Ringsystems 7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on wurde erstmals anhand der Synthese des 1-Azakenpaullons (**2a**) beschrieben.<sup>57,150</sup>

### 5.1.1 Synthese des 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylesters und des 3-Amino-6-brompyridin-2-carbonsäureethylesters

Dabei geht man von der Pyridin-2,3-dicarbonsäure (Chinolinsäure) **28** aus, die zunächst mit Acetanhydrid zum Anhydrid **29** umgesetzt wird. Das entstehende Intermediat wird nicht isoliert, anstelle dessen wird die entstehende Essigsäure abdestilliert und **29** mit Acetamid zum Chinolinimid **30** umgesetzt.<sup>151</sup>

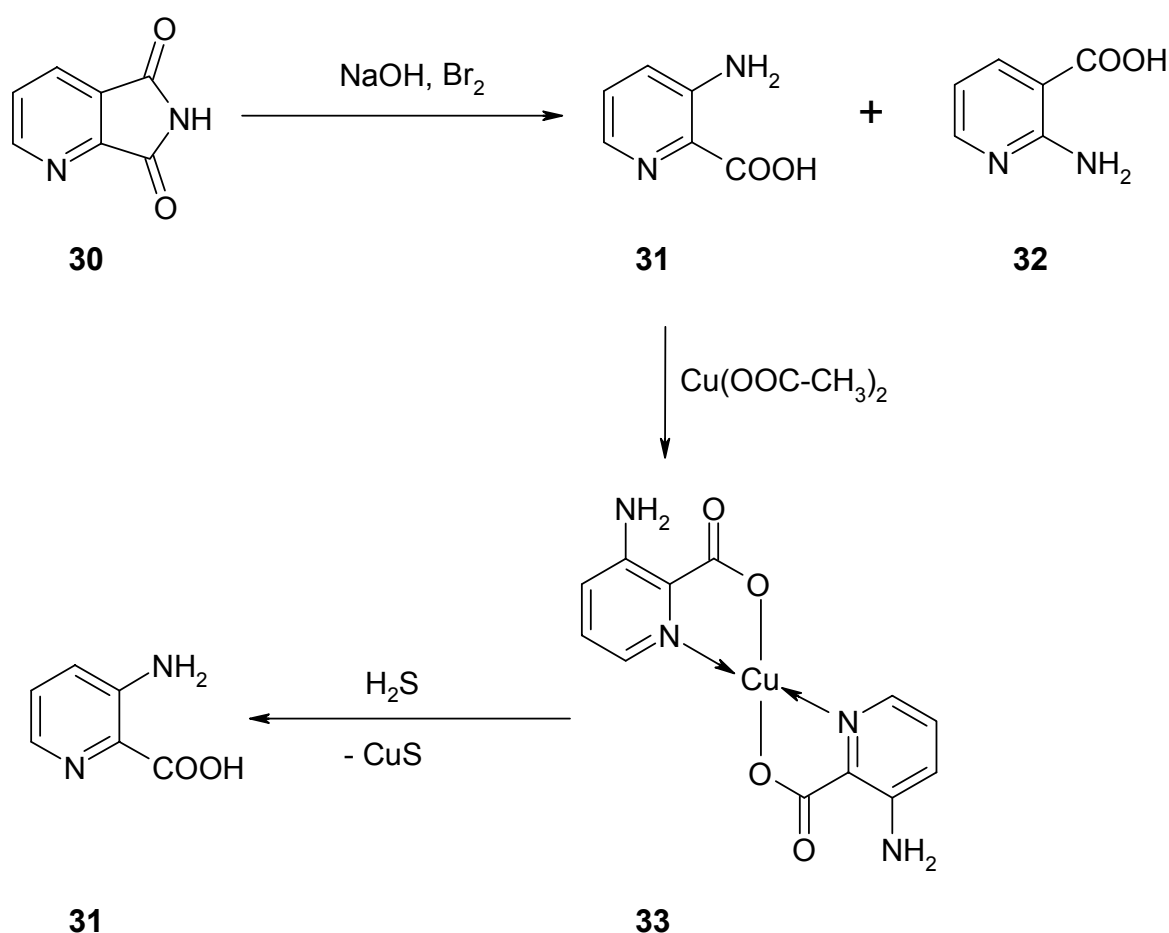
Schema 5-1: Synthese der Imids **30**





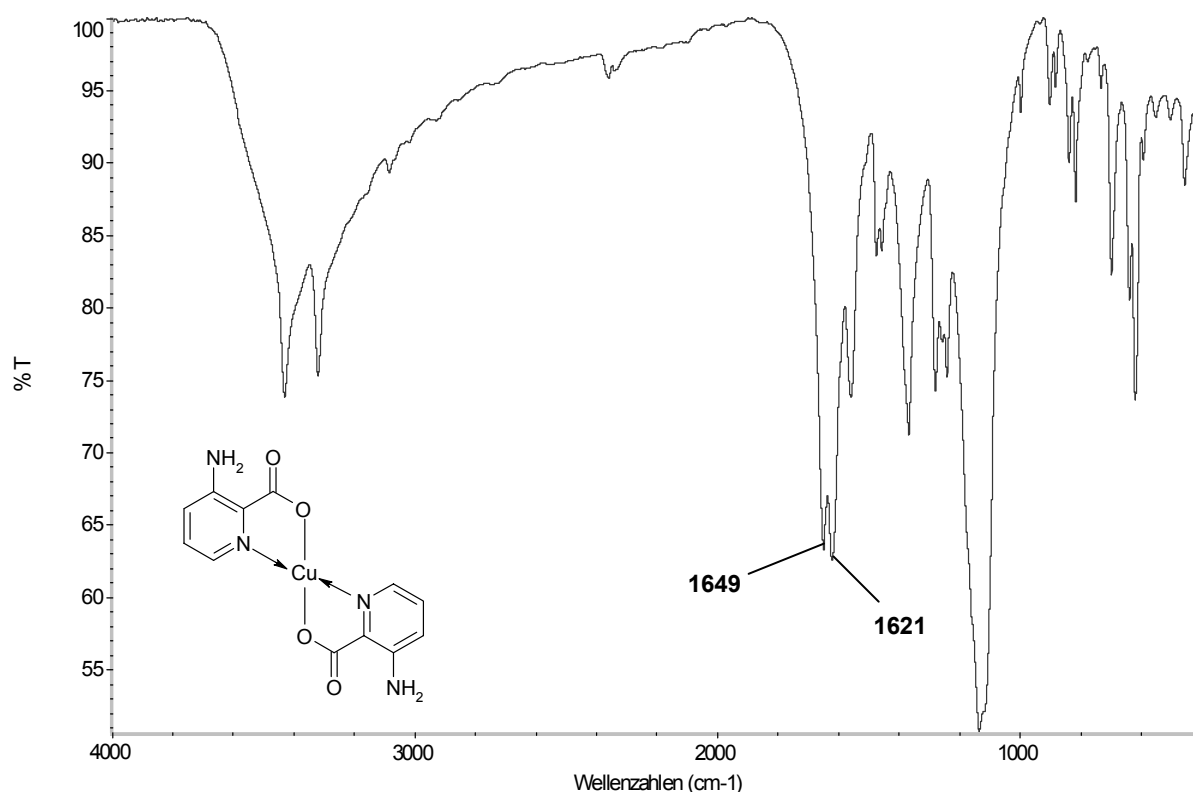
Das entstandene Imid **30** wird anschließend einem Hofmann-Abbau unterworfen, um die gewünschte 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (3-Aminopicolinsäure) (**31**) zu erhalten. Sucharda beschreibt eine Methode mit Hypochlorit,<sup>151</sup> eine spätere Publikation berichtet jedoch von höheren Ausbeuten bei Einsatz von Natriumhypobromit,<sup>152</sup> da beim Abbau durch diese Methode die Entstehung des Konstitutionsisomers 2-Aminonicotinsäure (**32**) verringert wird.

Schema 5-2:      Synthese der 3-Aminopicolinsäure (**31**)



Die Trennung der strukturisomeren Aminocarbonsäuren **31** und **32** erfolgt durch Ausbildung eines bidenten Chelatkomplexes **33** mit Kupfer(II)-Ionen. Dabei erfolgt die Komplexierung vermutlich durch die Carboxylfunktion und das freie Elektronenpaar des Pyridin-Stickstoffs, und nicht über die Amino-Gruppe wie bei Lauenroth angenommen.<sup>150</sup> Diese Vermutung wird durch Vergleich der IR-Daten und der Struktur eines Komplexes gestützt, in dem drei Wasser- und drei 3-

Aminopicolinsäure-Moleküle mit einem Terbium(III)-Kation komplexiert vorliegen. Dabei beschreiben die Autoren, dass das  $\text{Tb}^{3+}$ -Kation als harte Lewis-Säure mit dem harten Carboxyl-Sauerstoff bindet. Die Koordination über den Pyridin-Stickstoff wird mit der höheren Basizität des Pyridin-Stickstoffs im Vergleich zu dem Amin-Stickstoff begründet, wodurch eine festere Bindung ermöglicht wird. Das IR-Spektrum des Terbium-Komplexes zeigt eine zu kleineren Wellenzahlen verschobene antisymmetrische Streckschwingung der Carboxyl-Funktion ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ) im Vergleich mit dem freien Liganden ( $1649\text{ cm}^{-1}$ ). Dieses deutet daraufhin, dass das Kation über die Carboxyl-Funktion der 3-Aminopicolinsäure gebunden ist.<sup>153</sup> Das IR-Spektrum von **33** zeigt die gleiche Verschiebung, was darauf hindeutet, dass das Kupfer(II)-Kation als mittelstarke Lewis-Säure ebenfalls über die Carboxyl-Funktion gebunden wird. Zur präparativen Gewinnung wird der Ligand aus dem Kupferkomplex freigesetzt, indem das Kupfer(II)-Kation mit Schwefelwasserstoff als Kupfer(II)-sulfid gefällt wird.

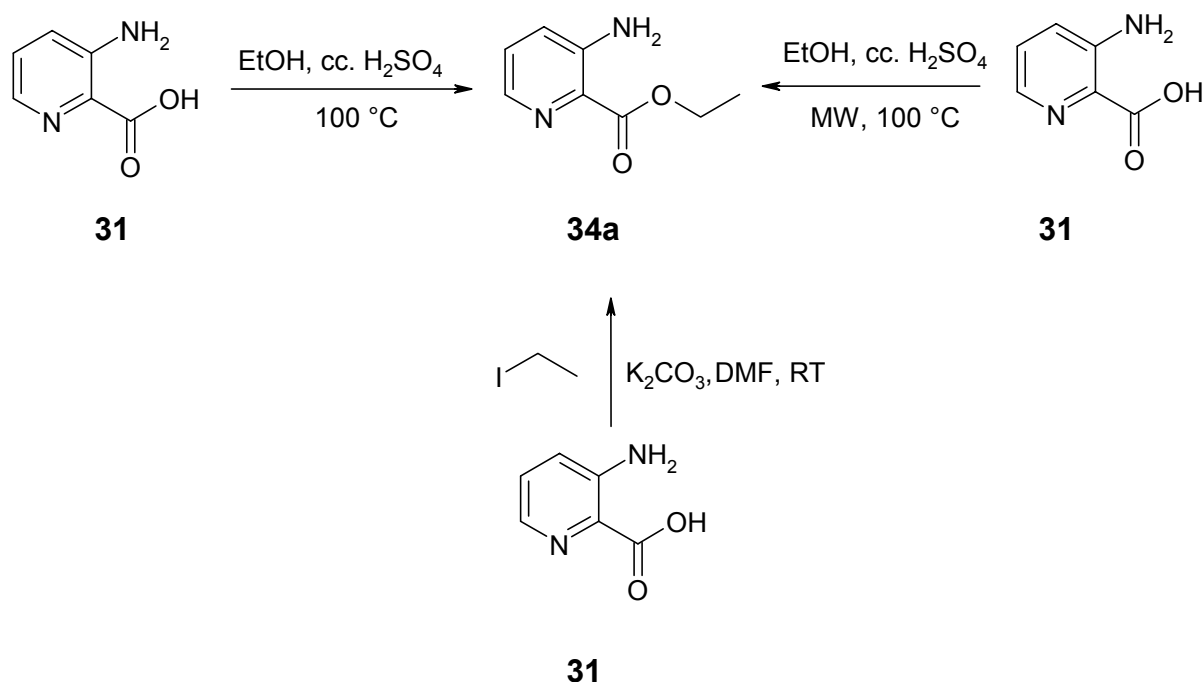
Abbildung 5-1: IR-Spektrum eines Gemisches aus **31** und **33**

Die Bande bei 1649 cm<sup>-1</sup> entspricht der Carbonyl-Streckschwingung des freien Liganden; die Bande bei 1621 cm<sup>-1</sup> der Carbonyl-Streckschwingung des Liganden in komplexierter Form.

Die erhaltene 3-Aminopicolinsäure (**31**) wird anschließend zu dem entsprechenden Ethylester umgesetzt, wobei drei verschiedene Methoden gewählt wurden. Zunächst wurde eine Veresterung mit Iodethan in Gegenwart von Kaliumcarbonat gewählt. Die Ausbeuten waren jedoch sehr gering, so dass die von V. Oakes, R. Pascoe und H. N. Rydon zuerst beschriebene Methode gewählt wurde,<sup>152</sup> wobei Q. Chen und L. W. Deady eine Erhöhung der Ausbeute durch längere Reaktionszeiten feststellten:<sup>154,155</sup> Die 3-Aminopicolinsäure (**31**) wird in getrocknetem Ethanol unter Katalyse von konzentrierter Schwefelsäure zum 3-Aminopicolinsäureethylester (**34**) umgesetzt. Dabei wird der Ansatz 24 h zum Rückfluss erhitzt. Verlängerung der Reaktionszeit auf 70 h und Änderung des Verhältnisses von Schwefelsäure und trockenem Ethanol erhöhte die Ausbeute.<sup>156</sup> Nochmaliges Verlängern der Reaktionszeit auf 90 h führte schließlich zu einer 61-prozentigen Ausbeute an **34**. Um die Reaktionszeit zu verkürzen, wurde auf diese Methode die Erhitzung mittels Mikrowelle (MW) angewandt. Für 30 Minuten wurde bei 100 °C erhitzt. Die Ausbeuten bei dieser

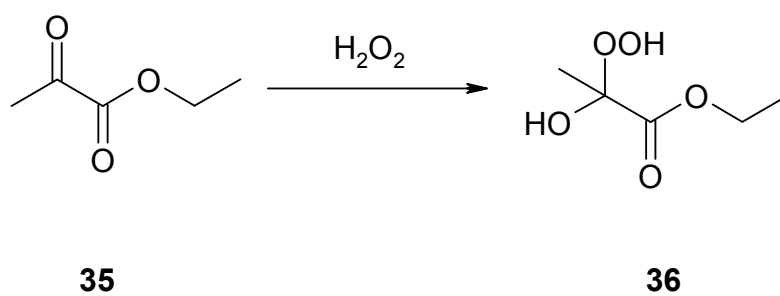
Methode lagen jedoch nur bei 10%, so dass die zuvor beschriebene Methode vorzuziehen war.

Schema 5-3: Veresterung der 3-Aminopicolinsäure (**31**)

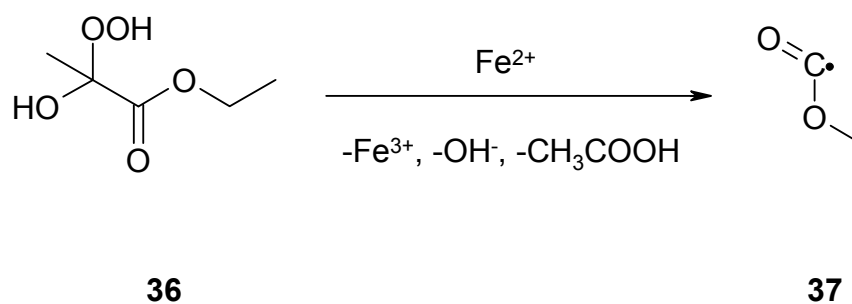


In der Literatur war eine weitere Methode beschrieben, die den Zugang zu dem 3-Aminopicolinsäureethylester vorsieht.<sup>157</sup> Laut dieser Vorschrift wurde bei -10 °C Brenztraubensäureethylester (**35**) mit konzentrierter Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt (Schema 5-4). Das dabei gebildete Reagenz **36** wird nachfolgend unter Rühren bei 0 - 5 °C mit einer schwefelsauren Lösung aus 3-Aminopyridin und Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat versetzt. Das Protokoll beschreibt eine Umsetzung von **36** mittels Eisen(II)-Ionen zu dem Ameisensäureethylesterradikal **37** (Schema 5-5). **37** ist in der Lage, das 3-Aminopyridin in den Positionen 2 und 6 radikalisch anzugreifen, so dass es zur Ausbildung der Derivate **34a**, **38** und **39** im Verhältnis 8:1: 3,5 kommen sollte (Schema 5-6). Nach der Aufarbeitung sollten alle drei Produkte aus dem Ansatz isolierbar sein. Trotz verschiedener Versuche, das Produktgemisch aufzuarbeiten (Säulenchromatographie, präparative HPLC), gelang es nicht, die vorgeschlagene Methode zu reproduzieren, so dass die zuvor beschriebene Vorgehensweise weiterhin beschritten wurde.

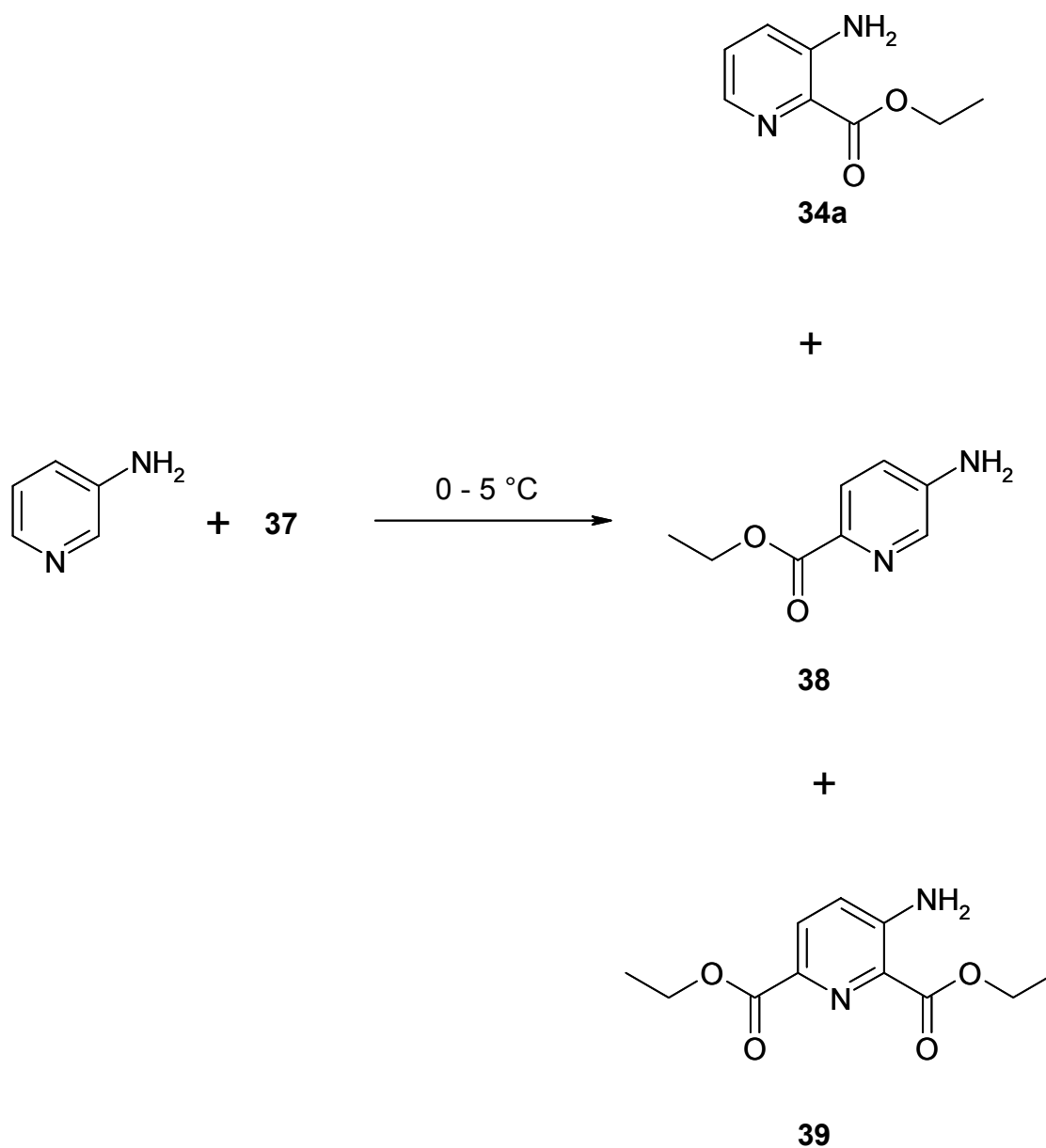
Schema 5-4: Bildung der Peroxidspezies **36**



Schema 5-5: Bildung des Ameisensäureethylesterradikals

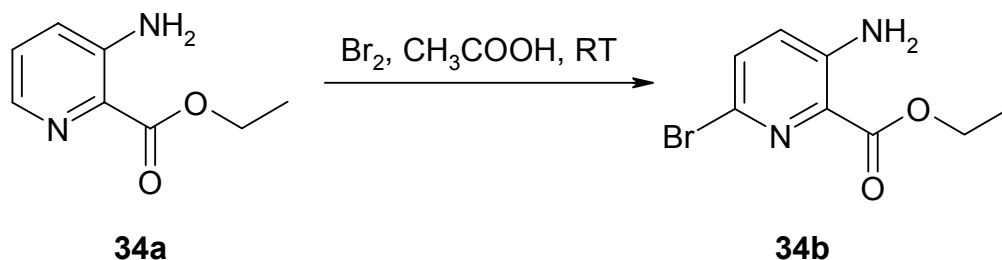


Schema 5-6:      Synthese verschiedener Aminopyridincarbonsäureethylester



Um weitere Möglichkeiten der späteren Derivatisierung zu erschließen, sollte der Ester **34a** in Position 6 substituiert werden. Dazu wurde **34** unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure in Wasser gelöst und starkem Rühren mit einer Lösung von Brom in Eisessig versetzt. Der dabei entstehende 3-Amino-6-brompyridin-2-carbonsäureethylester fiel aus der Lösung aus und konnte in 74-prozentiger Ausbeute erhalten werden (Schema 5-7).<sup>158</sup>

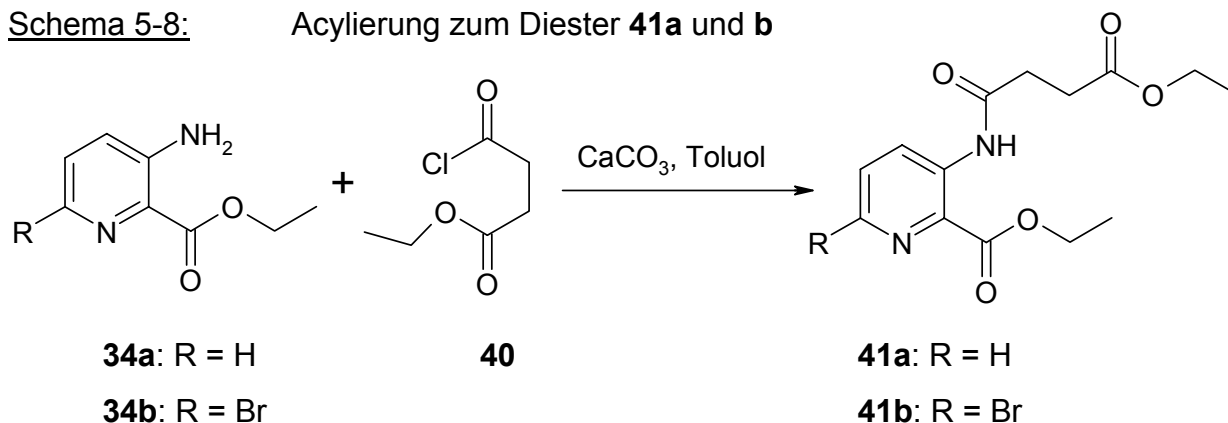
Schema 5-7: Bromierung von **34a**



### 5.1.2 Synthese des 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions und des 2-Brom-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions

Die Ester **34a** und **b** sollten nachfolgend an der Amino-Funktion mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**40**) acyliert werden (Schema 5-8). In der Literatur sind dazu geeignete Methoden zu finden,<sup>159</sup> die entsprechend abgewandelt wurden: **34a** bzw. **b** wurden mit **40** in Toluol refluxiert, wobei Calciumcarbonat als Hilfsbase eingesetzt wurde.<sup>57,150</sup>

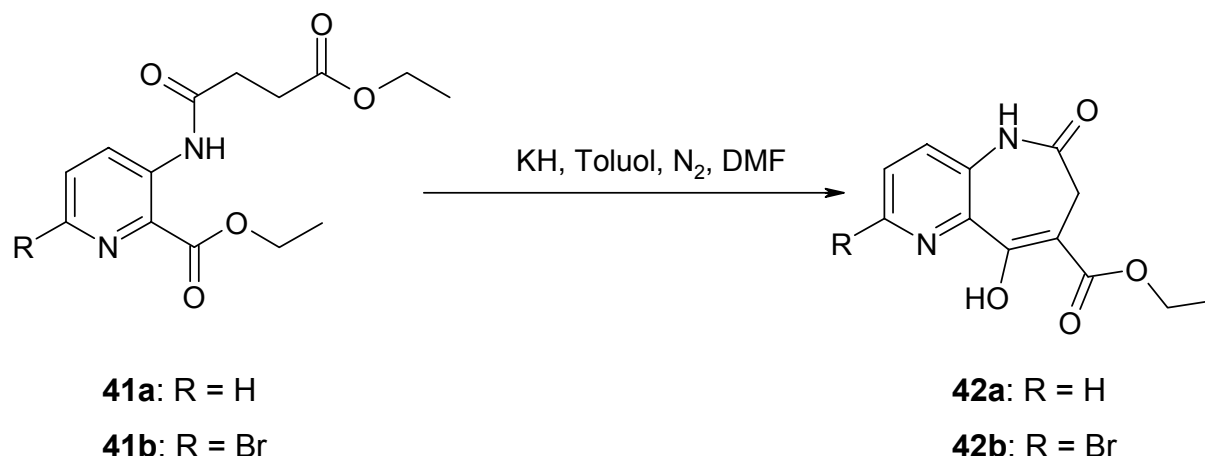
Schema 5-8: Acylierung zum Diester **41a** und **b**



Die erhaltenen Verbindung, der 3-[4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl]amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**41a**) und dessen 6-Bromanalogon **41b** wurden dann in einer Dieckmann-Esterkondensation ringgeschlossen. Dabei wurde die von Kunick entwickelte Methode verwendet, die Kaliumhydrid in Toluol als Base vorsieht.<sup>160</sup> In Analogie zu den entsprechenden Paullonvorstufen<sup>55</sup> wurden der 9-Hydroxy-6-oxo-

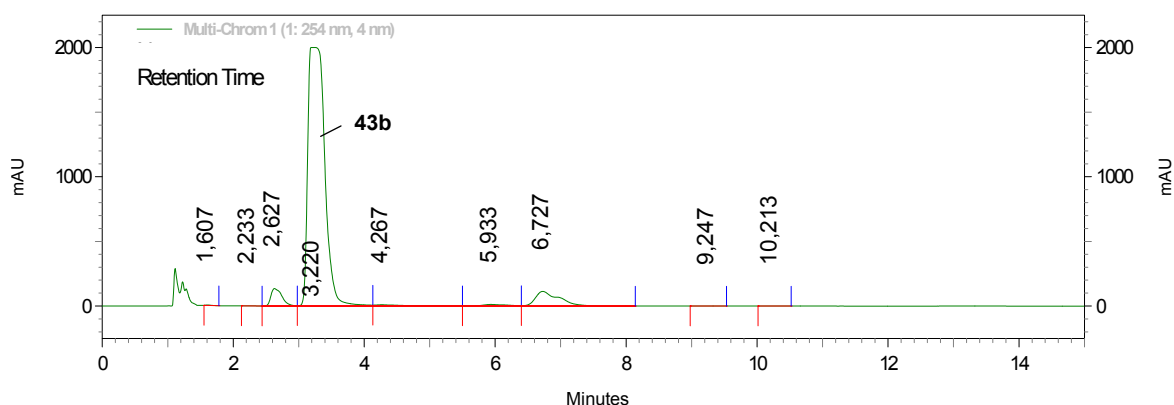
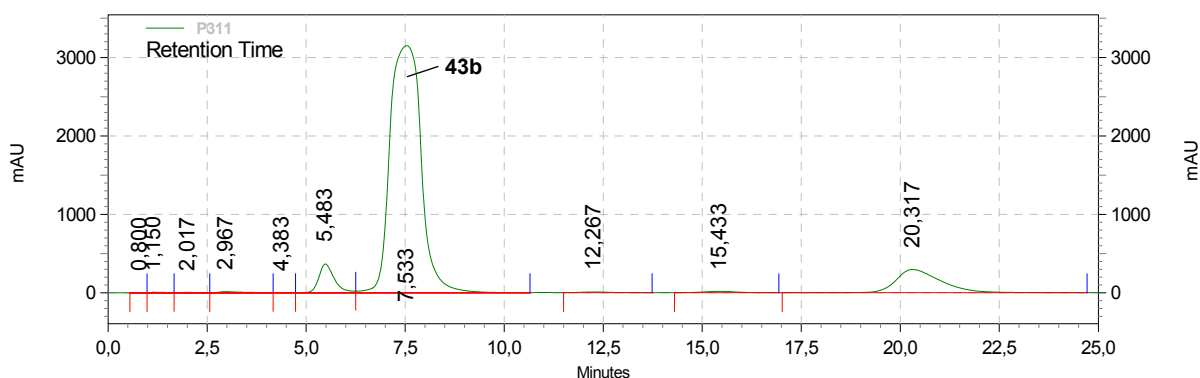
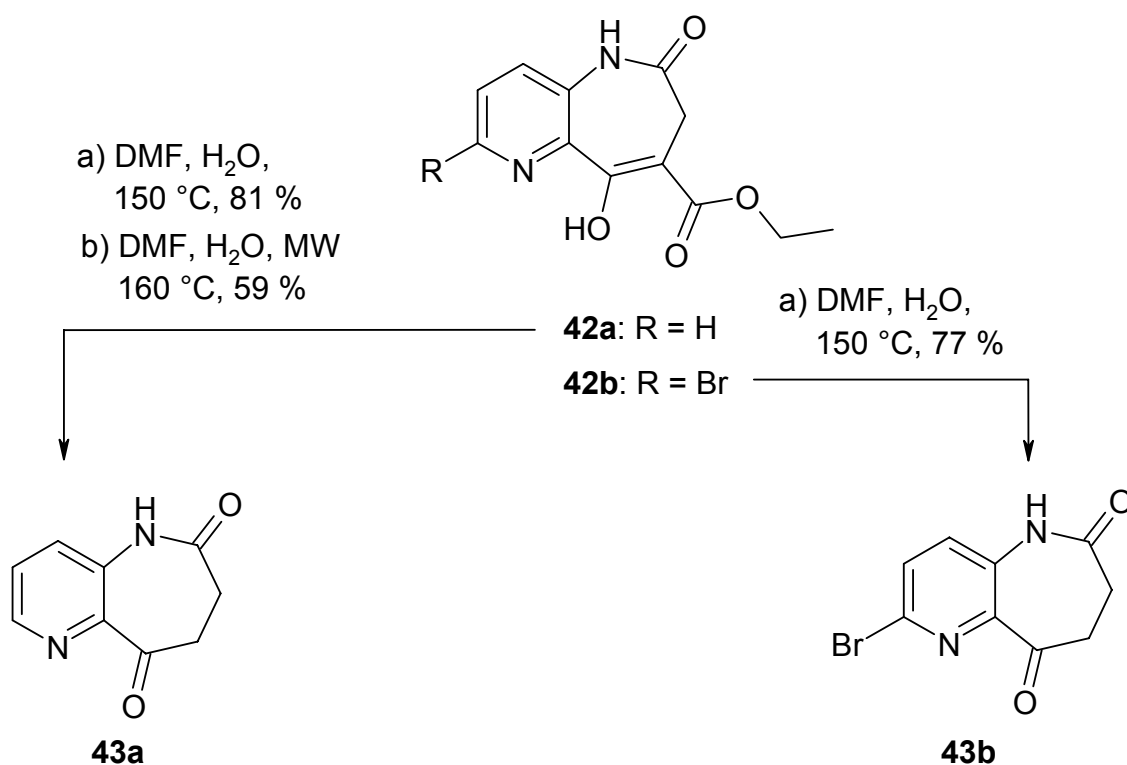
6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**42a**) und der 2-Brom-9-hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**42b**) gebildet (Schema 5-9).<sup>57,150</sup>

Schema 5-9:      Synthese von **42a** und **b** durch eine Dieckmann-Esterkondensation



Die  $\beta$ -Hydroxyester **42a** und **b** wurden bei 150 °C in wässrigem *N,N*-Dimethylformamid (DMF) unter Erhalt des 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions (**43a**) bzw. des 2-Brom-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions (**43b**) dealkoxycarbonyliert. Bei dieser Synthese wird keine vollständige Umsetzung erreicht,<sup>150</sup> auch nicht bei Erhitzung in der Mikrowelle (Schema 5-10); die erreichbaren Ausbeuten für **43a** ergaben 81 % bei konventionellem Erhitzen und 59 % bei Erhitzen in der Mikrowelle. Die Verbindung **43b** konnte durch präparative HPLC gereinigt und in 77-prozentiger Ausbeute erhalten werden. Zunächst wurde eine chromatographische Trennung in analytischem Maßstab ausgearbeitet (Abbildung 5-2). Diese Methode wurde dann erfolgreich auf eine präparative HPLC-Anlage transferiert. Bei der Entwicklung der analytischen Methode wurde ein Säulenofen benutzt, der bei 40,0 °C temperiert war. Da die Trennung im präparativen Maßstab bei Raumtemperatur erfolgte, wurde bei späteren Retentionszeiten eluiert, die Reihenfolge der eluierten Verbindungen blieb unverändert (Abbildung 5-3).

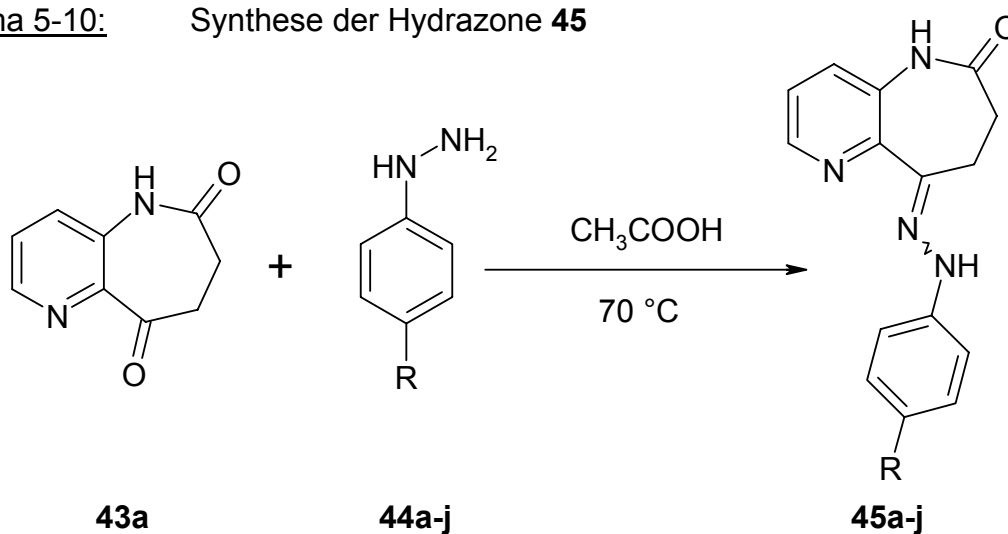


Abbildung 5-2: Chromatogramm von **43b** im analytischen MaßstabAbbildung 5-3: Chromatogramm von **43b** im präparativen MaßstabSchema 5-10: Dealkoxycarbonylierung der  $\beta$ -Hydroxyester **42a** und **b**

### 5.1.3 Synthese der 7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5*H*)-one

Die Verbindung **43a** konnte dann mit den substituierten Phenylhydrazinen **44a-j** zu den entsprechenden Hydrazonen **45a-j** umgesetzt werden, die anschließend isoliert wurden (Schema 5-10).

Schema 5-10: Synthese der Hydrazone **45**

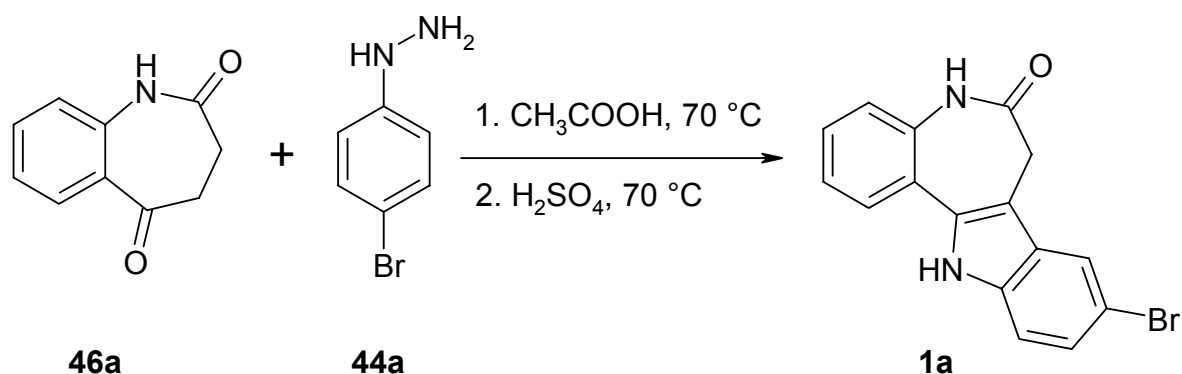


	R =		R =
<b>a</b>	Br	<b>f</b>	I
<b>b</b>	F	<b>g</b>	H
<b>c</b>	-CN	<b>h</b>	COOH
<b>d</b>	CF <sub>3</sub>	<b>i</b>	OCH <sub>3</sub>
<b>e</b>	Cl	<b>j</b>	CH <sub>3</sub>

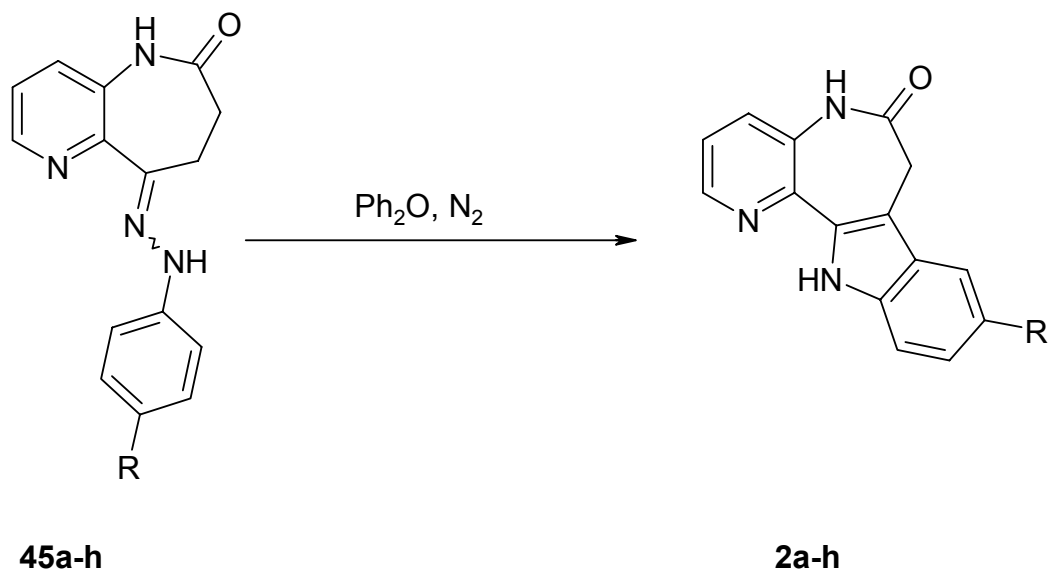
Die Isolierung der Hydrazone stellt eine Abwandlung von der Synthese der Paullon-Derivate dar. Wie in Schema 5-11 abgebildet, erfolgt die Paullon-Synthese ohne Isolierung des entsprechenden Hydrazons. So wird zum Beispiel das 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**) in Eisessig mit **44c** gerührt. Nach Umsetzung zum Hydrazone lässt man auf Raumtemperatur abkühlen, setzt wenige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zu und erhitzt wieder bei 70 °C. Dabei kommt es in einer säurekatalysierten Fischer-Indolsynthese zum Ringschluss, wobei Kenpaullon

(**1a**) entsteht.<sup>161</sup> Bei gleicher Vorgehensweise wird beim Einsatz des Aza-Derivates **43a** anstelle von **46a** ein Produktgemisch erhalten.<sup>150</sup> Fischer-Indolsynthesen können sowohl durch Säuren oder Lewis-Säuren als auch thermisch induziert werden.<sup>162</sup> Durch Erhitzen in siedendem Diphenylether konnte das Hydrazone **45a** zu 1-Azakenpaullon (**2a**) umgesetzt werden.<sup>57,150</sup> Diese Reaktion konnte reproduziert werden und ließ sich auch auf die Hydrazone **45b-h** anwenden, so dass die entsprechenden Azapaullone **2b-h** dargestellt werden konnten (Schema 5-12). Nach Reinigung der aus den Phenylhydrazinen **44i** und **44j** hervorgegangenen Produkte durch Umkristallisation in Ethanol wurde festgestellt, dass nicht die Hydrazone entstanden waren, wie zunächst angenommen. Durch den elektronenschiebenden Effekt der Methoxy- und Methyl-Substituenten kam es unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zur Zyklisierung zu den Azapaullonen **2i** und **j** (Schema 5-13). Die Reaktivität der Hydrazone bei dem vorliegenden Substitutionsmuster ermöglichte die Umsetzung bereits in siedendem Ethanol. Substituenteneffekte bei thermisch induzierten Fischer-Indolsynthesen sind bekannt. Beispielsweise zeigte ein Cyclohexanon-(4-methylphenyl)hydrazon schnellere Umsetzung zum entsprechenden Tetrahydrocarbazol als Cyclohexanon-(4-chlorphenyl)hydrazon. Die gewählten Lösungsmittel (Ethylenglycol bzw. n-Dekan) hatten dabei keine Auswirkung auf die Umsetzungsrate.<sup>163</sup>

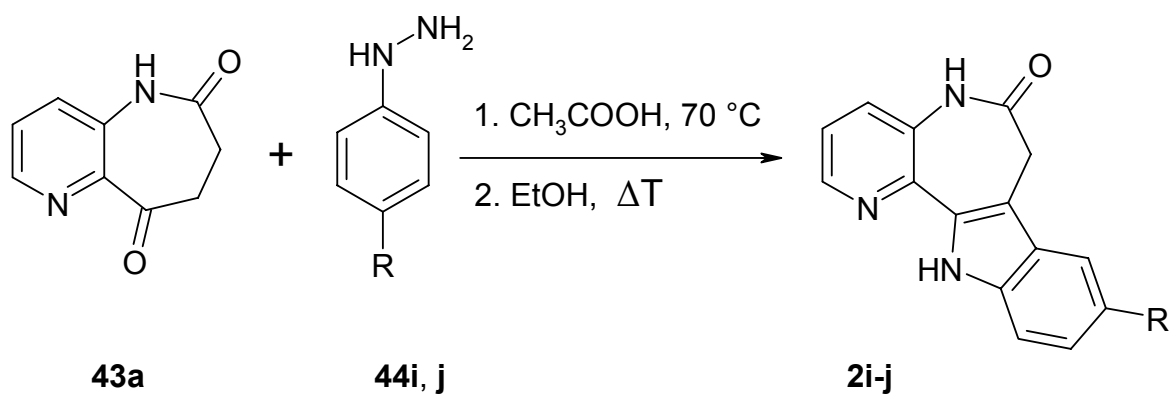
Schema 5-11: Kenpaullon-Synthese



**Schema 5-12:** Thermische Fischer-Indolsynthese



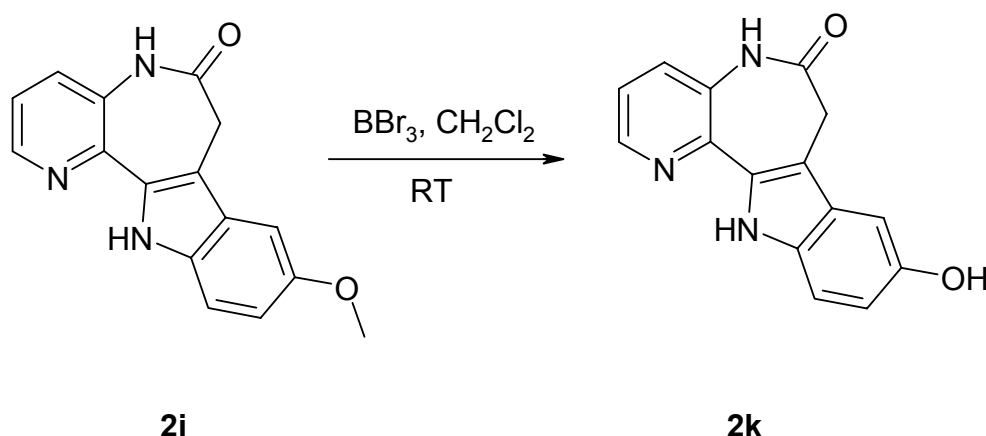
**Schema 5-13:** Zyklisierung zu den Strukturen **2i-j** in siedendem Ethanol



	R =		R =	
<b>2a</b>	Br	<b>2f</b>	I	
<b>2b</b>	F	<b>2g</b>	H	
<b>2c</b>	-CN	<b>2h</b>	COOH	
<b>2d</b>	CF <sub>3</sub>	<b>2i</b>	OCH <sub>3</sub>	
<b>2e</b>	Cl	<b>2j</b>	CH <sub>3</sub>	

Ausgehend von dem 9-Methoxyazapauillon (**2i**) kann nach einer Vorschrift von McOmie und Mitarbeitern durch Einsatz von Bortribromid in trockenem Dichlormethan der Methylether gespalten werden, so dass das 9-Hydroxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2k**) erhalten wird (Schema 14).

Schema 5-14: Etherspaltung mittels Bortribromid



#### 5.1.4 Einsatz alternativer Lösungsmittel in der thermischen Fischer-Indolsynthese

##### 5.1.4.1 Mikrowellen-induzierte Synthese in Wasser

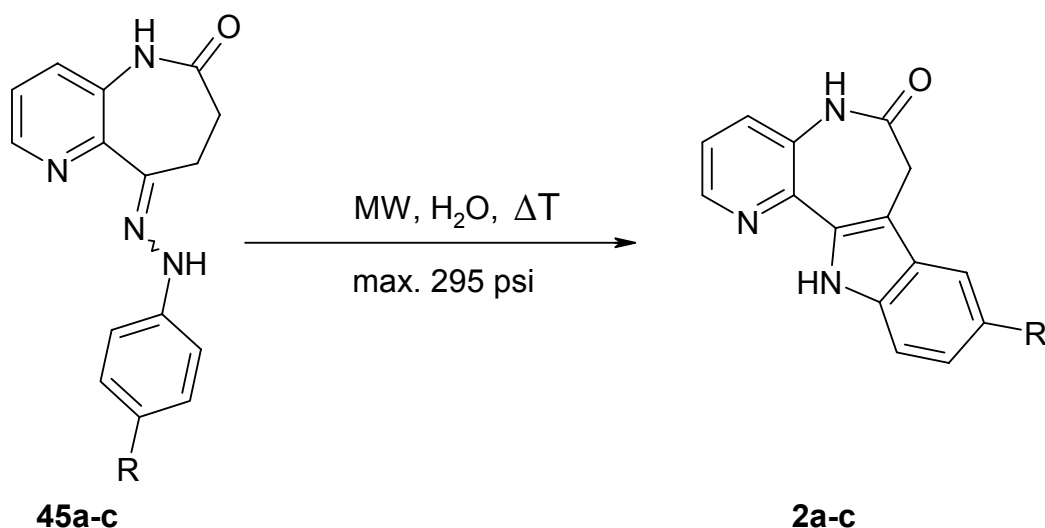
Hochtemperiertes Wasser (Near critical water, NCW) hat Einzug als Reaktionsmedium bei einer Vielzahl von Reaktionen der organischen Chemie gehalten. Neben Umweltschutz- und Sicherheitsaspekten spielen die einzigartigen Lösungsmiteleigenschaften eine wesentliche Rolle beim Einsatz von Wasser in der Mikrowellen-induzierten Synthese. Neben Hydrolysen und Hydratationen sind auch Reaktionen wie die Pinakol-Umlagerung, die Diels-Alder-Reaktion oder die Fischer-Indolsynthese in der Literatur dargelegt.<sup>164</sup> Die thermische Fischer-Indolsynthese in NCW ist erstmalig von Strauss und Mitarbeitern<sup>165,166</sup> beschrieben worden und in einem von ihnen entwickelten Multimode-Mikrowellen-Prototypen<sup>167</sup> durchgeführt worden. In Temperaturbereichen von 200 – 300 °C ändern sich die physikalischen

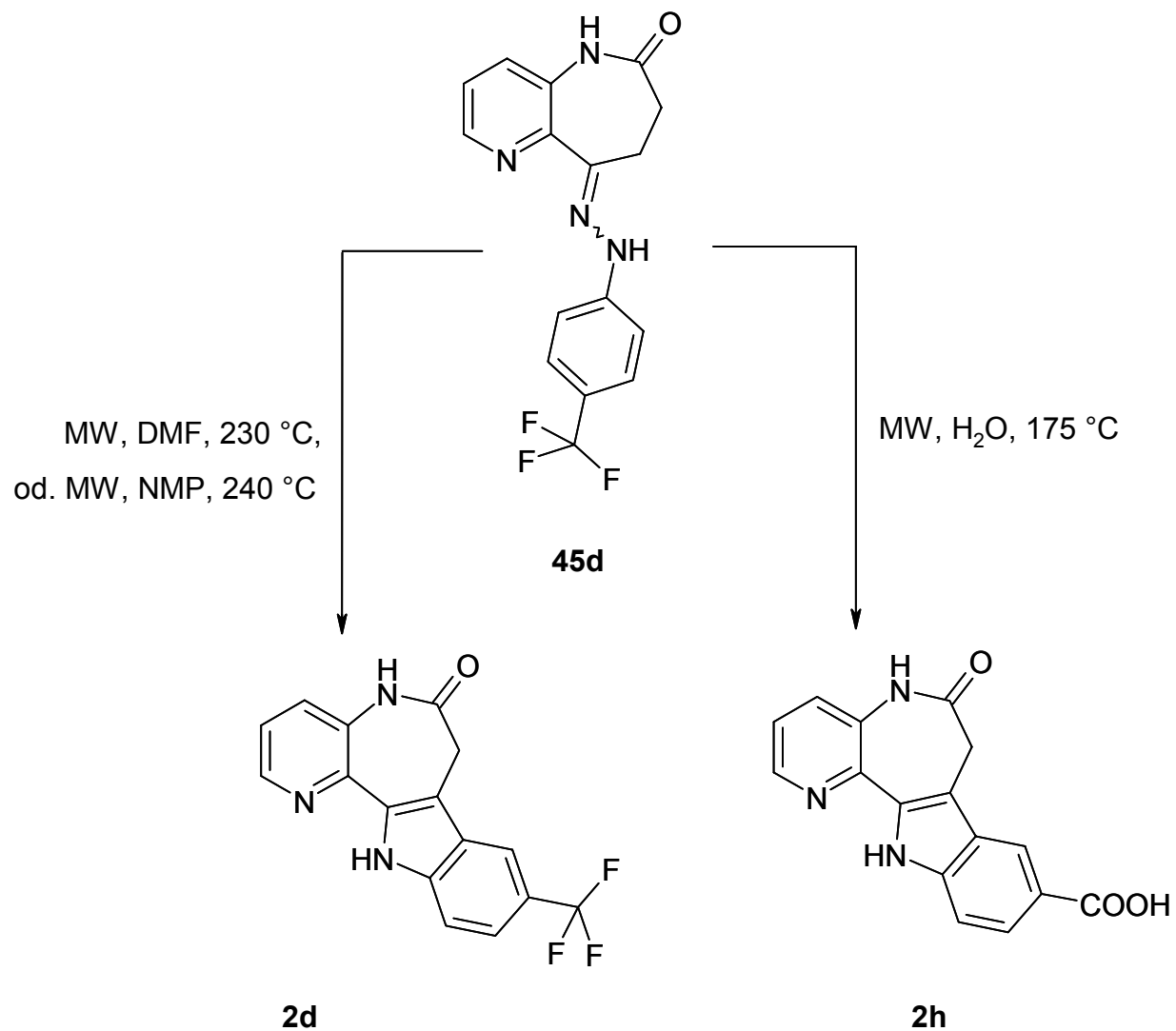
und chemischen Eigenschaften von Wasser erheblich und es wird zu einem geeigneten Solvens für die organische Synthese. Die Unterschiede werden deutlich, wenn man verschiedene Parameter des Wassers bei 25 °C bzw. bei 250 °C vergleicht: Die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon'$  sinkt von 78,5 auf 27,1 (entspricht dem Wert für Acetonitril bei Raumtemperatur), die Dichte  $\rho$  fällt von 0,997 auf 0,80 g/cm<sup>-3</sup> und das Ionenprodukt  $pK_W$  sinkt von 14,0 auf 11,2.<sup>168</sup> Wasser ist der Einteilung nach nur ein mittelmäßiges Absorbens für Mikrowellen mit einem dielektrischen Verlustfaktor von  $\tan \delta = 0,123$ . Dieser Faktor gibt die Fähigkeit eines Stoffes an, elektromagnetische Energie bei gegebener Frequenz und Energie in Wärme umzuwandeln. Er errechnet sich aus dem Quotienten des Dielektrizitätsverlustes  $\epsilon''$ , der die Effizienz der Umwandlung von elektromagnetischer Energie in Wärme angibt, und der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon'$ , die die Polarisierbarkeit der Moleküle durch das elektrische Feld beschreibt. Effiziente Absorption und demzufolge rasches Aufheizen setzt voraus, dass  $\tan \delta$  für das Reaktionsmedium groß ist. Stark absorbierende Solventien haben Werte von  $\tan \delta > 0,5$ , schwache von  $\tan \delta < 0,1$ , mittlere liegen dazwischen.<sup>169</sup> Trotz des nur mittleren dielektrischen Verlustfaktors von Wasser eignet es sich sehr gut für mikrowelleninduzierte Reaktionen, da es sich im Bereich zwischen 20 - 150 °C sehr schnell aufheizen lässt.<sup>164</sup> Das Erhitzen mit Mikrowellen liegt darin begründet, dass sich die Dipole oder Ionen nach dem angelegten Feld ausrichten. Das Feld oszilliert und die Dipole und Ionen versuchen sich erneut auszurichten, wobei durch Molekularreibung und Dielektrizitätsverlust Wärmeenergie frei wird. Die erzeugte Energie ist abhängig von der Fähigkeit der Matrix, sich mit der Frequenz des angelegten Feldes auszurichten. Es findet keine Erwärmung statt, wenn sich der Dipol zu schnell im Feld ausrichtet, bzw. er zu wenig Zeit hat, sich zu orientieren. Die Frequenz handelsüblicher Mikrowellen beträgt 2,45 GHz. Bei dieser Frequenz hat der Dipol genug Zeit sich auszurichten, kann dem oszillierenden Feld aber nicht exakt folgen. Verschiedene weitere Komponenten der Erhitzung mittels Mikrowellen werden diskutiert, die mit konventionellem Erhitzen nicht möglich sind. Dies sind im Wesentlichen thermische Effekte wie z.B. Überhitzungseffekte bei Atmosphärendruck oder das Beseitigen von Wandeffekten durch einen inversen Temperaturgradient (Erhitzen des Inhalts, nicht des Gefäßes). Weiterhin werden athermische Mikrowellen-Effekte kontrovers diskutiert, von denen angenommen wird, dass sie durch Wechselwirkungen des elektrischen Feldes mit einigen Molekülen im Reaktionsansatz zusammenhängen.<sup>169</sup>

### 5.1.4.2 1-Azapauellone durch Synthese in NCW

Auch der letzte, zur Zielstruktur führende Syntheseschritt sollte durch eine mikrowelleninduzierte Methode optimiert werden. Dazu wurden die Hydrazone **44a-d** in Wasser suspendiert und in einer Monomode-Synthesemikrowelle bei hohen Temperaturen und hohem Druck in Near critical water (NCW) umgesetzt. Die Temperatur wurde dabei so hoch wie möglich angesetzt, so dass gerade unterhalb der maximalen Druckgrenze von 300 psi operiert wurde (Schema 5-15). Dabei wurden je nach Verbindung Temperaturen zwischen 175 und 230 °C erreicht. Der Vorteil dieser Methode lag im Vergleich zum Erhitzen in Diphenylether in kürzeren Reaktionszeiten und einer besseren Reinheit der Zielstrukturen. Beim Versuch, Verbindung **44d** in Wasser zum Azapauellon **2d** zu zyklisieren, wurde eine Hydrolyse der Trifluormethyl-Gruppe zur Carboxyl-Funktion beobachtet, da die Verbindung **2h** aus dem Reaktionsansatz isoliert wurde. Der Wechsel zu polaren aprotischen Lösungsmitteln wie NMP und DMF ermöglichte die Zyklisierung zum gewünschten Trifluormethyl-Derivat **2d**, ohne dass Hydrolyse stattfand (Schema 5-16).

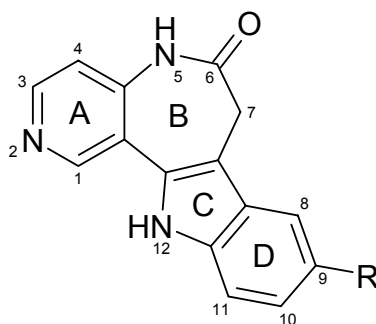
Schema 5-15: Thermische Fischer-Indolsynthese in NCW



Schema 5-16:Mikrowellen-induzierte Synthese von **2d** und **2h**



## 5.2 Synthese der in Position 9 substituierten 7,12-Dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one



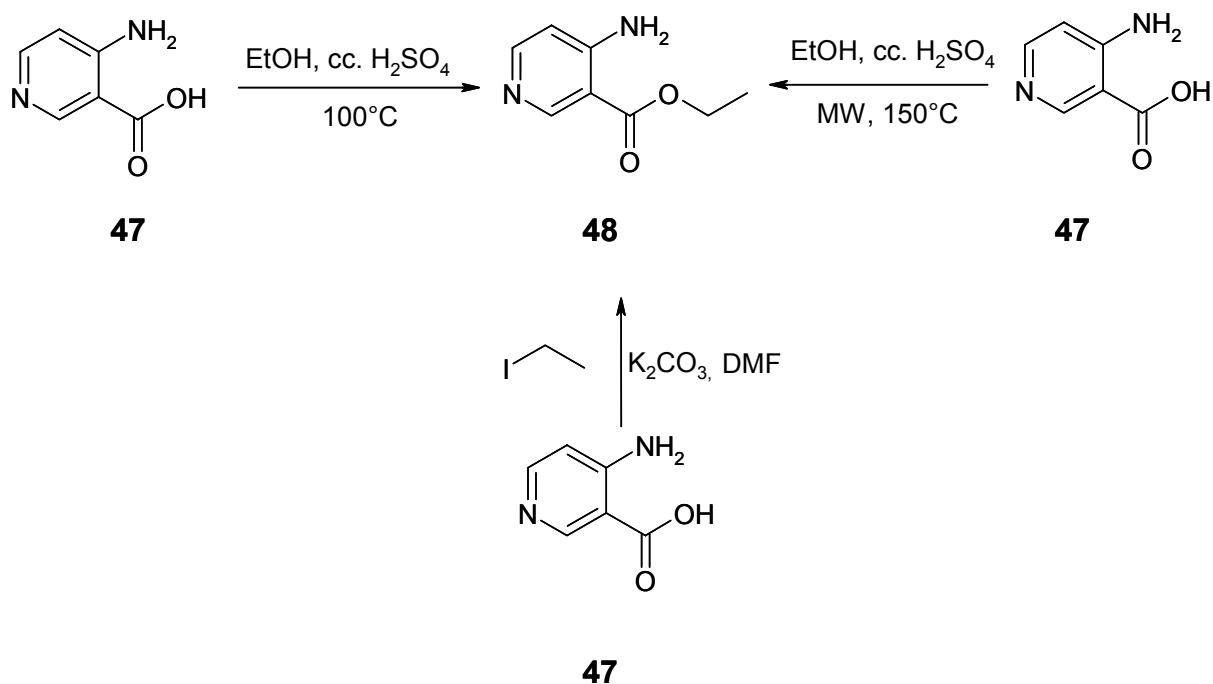
### 3

Das bisher unbekannte Ringsystem der 7,12-Dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one sollte chemisch zugänglich gemacht werden. Zunächst erfolgte analog den 1-Azaanaloga der Aufbau der Ringe A und B, um dann durch die Fischer-Indolsynthese das gesamte Ringsystem zu erschließen.

### 5.2.1 Synthese des 3,4-Dihydropyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dions

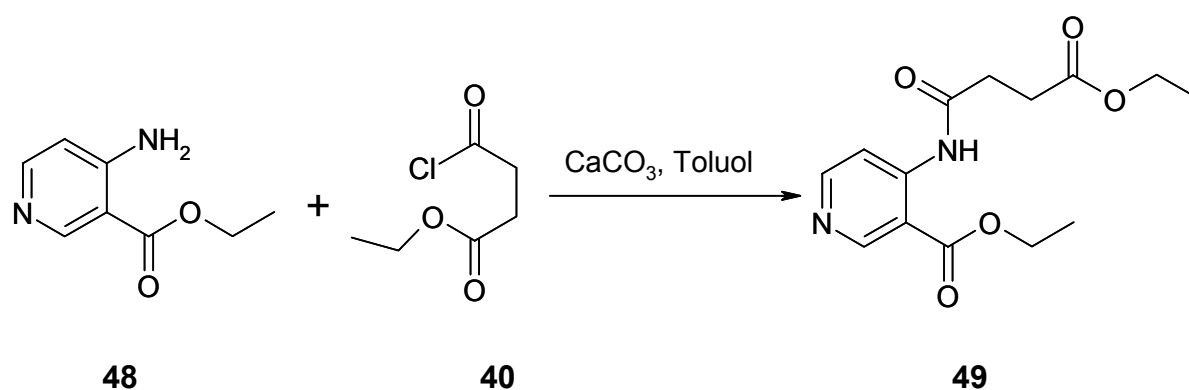
Der Zugang zu den 2-Azapauillonon erfolgte über die 4-Aminonicotinsäure (**47**), die unter verschiedenen Bedingungen zu dem entsprechenden Ethylester **48**<sup>170</sup> umgesetzt werden sollte. Dabei kamen die Methoden zum Einsatz, die schon bei der Synthese der 1-Azapauillone gewählt wurden. Taylor und Mitarbeiter erhitzen 4-Aminonicotinsäure (**47**) mit trockenem Ethanol in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure für 70 h zum Rückfluss und erhalten den 4-Aminonicotinsäureethylester (**48**) in 73-prozentiger Ausbeute.<sup>156</sup> Refluxieren für 90 Stunden erhöhte die Ausbeute auf 91 %. Der Transfer der Methode auf die Synthese-Mikrowelle lieferte keine höheren Ausbeuten (50%); auch die Umsetzung der 4-Aminonicotinsäure mit Ethyliodid und Kaliumcarbonat in DMF erwies sich nicht als Verbesserung der von Taylor vorgeschlagenen Methode, da der gewünschte Ester in nur 21-prozentiger Ausbeute erhalten wurde (Schema 5-17).

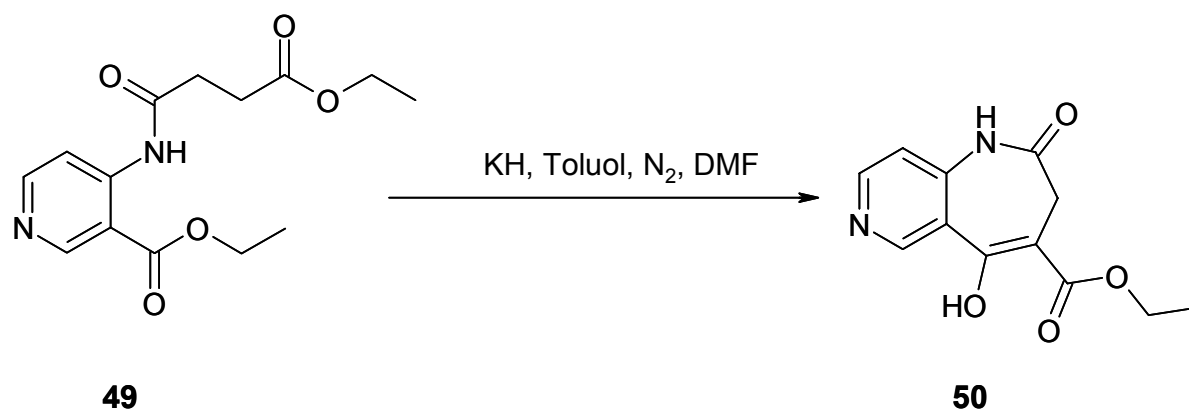
Schema 5-17:      Synthese des Esters **48**



Acylierung der Aminofunktion mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**40**) lieferte den Diester **49** (Schema 5-18). Der anschließende Ringschluss mit Kaliumhydrid wurde analog der 1-Azapauillonsynthese durchgeführt.<sup>57,150</sup> Dabei wurde der 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-4-carbonsäureethylester (**50**) in 67-prozentiger Ausbeute gewonnen (Schema 5-19).

Schema 5-18:      Synthese des Diesters **49**



**Schema 5-19:** Synthese von **50** durch eine Dieckmann-Esterkondensation

Bei der anschließenden Dealkoxycarbonylierung der Verbindung **50** zeigten sich ähnliche Probleme, wie sie schon für das 1-Aza-Analogon beschrieben wurden: Nach Erhitzen bei 150 °C in DMSO und anschließendem Eingießen in Wasser kristallisierte die gewünschte Verbindung auch nach längerem Kühlen nicht aus.<sup>150</sup> Fünfstündiges Rühren von **50** bei 150 °C in DMF unter Zusatz von Wasser führte nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum zum gewünschten 3,4-Dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-2,5-dion (**51**) (Schema 5-20). Durch Variation von Ansatzgröße und Lösungsmittelvolumen konnte bei dieser Reaktion die Ausbeute bis auf 86 % gesteigert werden. (Tabelle 5-1)

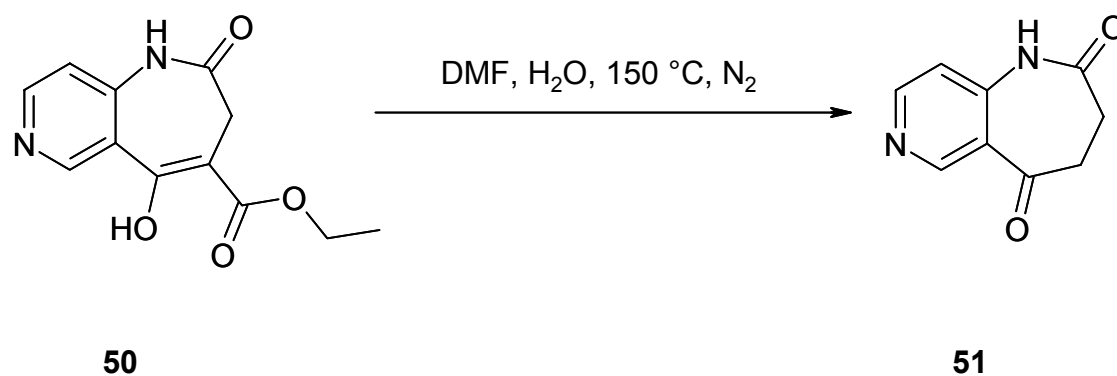
**Schema 5-20:** Dealkoxycarbonylierung von **50**

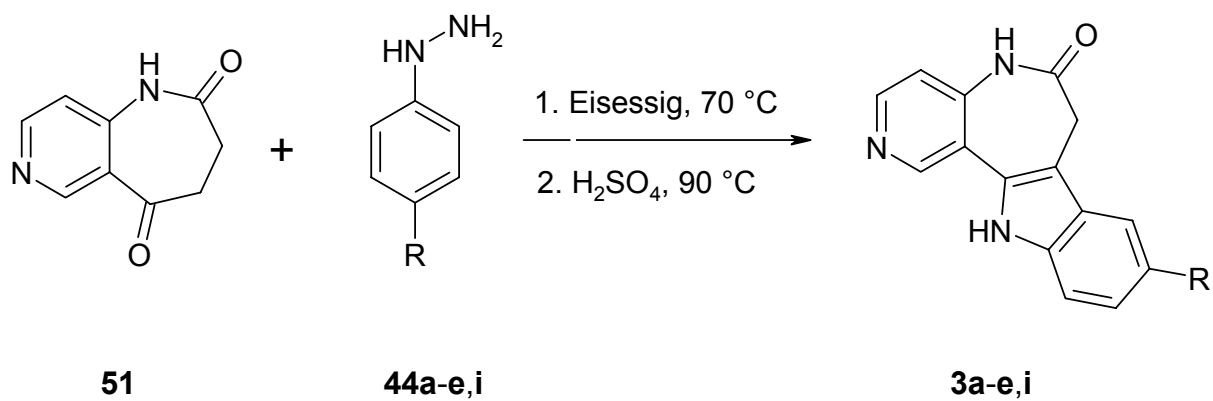
Tabelle 5-1: Methodenoptimierung der Dealkoxycarbonylierung von **50**

Ansatzgröße in mmol / mg	Volumen des Zweihalskolbens	Zugegebenes Wasser	Volumen an eingesetztem DMF	Ausbeute von Verbindung <b>51</b>
0,35 / 85	25 ml	2 Tropfen	10 ml	30 mg $\approx$ 49%
0,50 / 125	25 ml	2 Tropfen	15 ml	54 mg $\approx$ 61%
0,28 / 69	50 ml	2 Tropfen	20 ml	31 mg $\approx$ 63%
1,12 / 278	50 ml	4 Tropfen	20 ml	75 mg $\approx$ 38%
1,23 / 305	50 ml	4 Tropfen	30 ml	145 mg $\approx$ 67%
1,23 / 305	50 ml	4 Tropfen	35 ml	150 mg $\approx$ 69%
1,23 / 305	50 ml	4 Tropfen	40 ml	186 mg $\approx$ 86%
1,23 / 305	50 ml	4 Tropfen	50 ml	185 mg $\approx$ 85%

### 5.2.2 Synthese von in Position 9 substituierten 7,12-Dihydro-pyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-onen

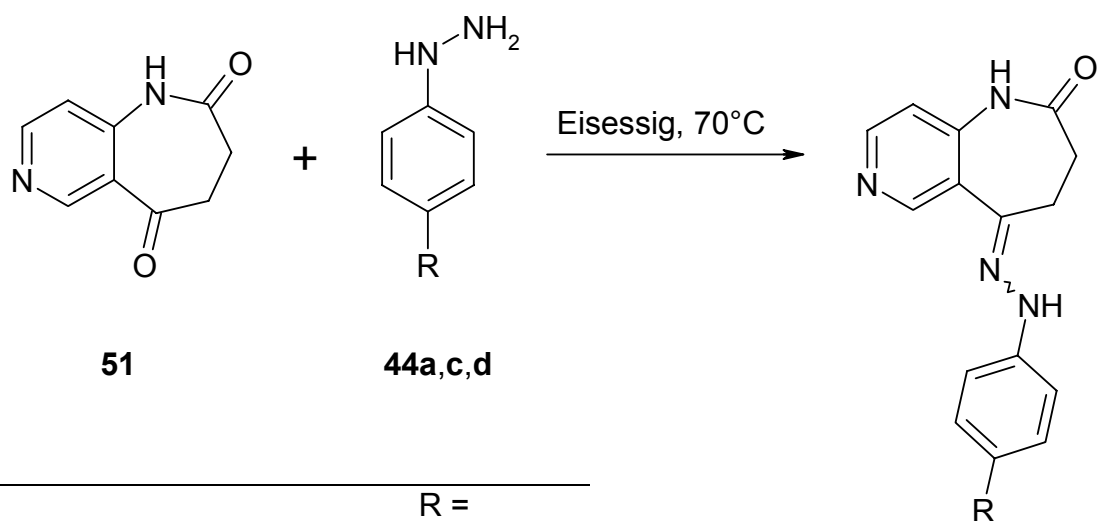
Verbindung **51** stellt die Ausgangsverbindung dar, deren Umsetzung nachfolgend erläutert wird. Sowohl thermische als auch säurekatalysierte Zyklisierungsmethoden wurden eingesetzt, um zu den gewünschten Verbindungen der allgemeinen Struktur **3** zu gelangen. Um die Verbindungen **3a-g** darzustellen, wurde das 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) mit einem entsprechend substituierten Phenylhydrazin **44a-e, i** bzw. dessen Hydrochlorid in Eisessig zunächst bei 70 °C und anschließend unter Zusatz von wenigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure bei 90 °C gerührt (Schema 5-21). Das dabei als Zwischenprodukt entstehende Hydrazon wurde per Dünnschichtchromatographie (DC) während der Reaktionskontrolle detektiert, aber nicht aus dem Ansatz isoliert. Thermisch gelang die Fischer-Indolsynthese (Schema 5-23), ausgehend von den entsprechenden zuvor synthetisierten Hydrazonen **52a-c** (Schema 5-22), unter Verwendung verschiedener Reaktionsbedingungen, wobei jedoch nur sehr geringe Ausbeuten erhalten wurden (Tabelle 5-2).

Schema 5-21: Säurekatalysierte Fischer-Indolsynthese der 2-Azapauillone **3**



	R =			R =	
<b>a</b>	Br		<b>d</b>	CF <sub>3</sub>	
<b>b</b>	F		<b>e</b>	Cl	
<b>c</b>	-CN		<b>i</b>	OCH <sub>3</sub>	

Schema 5-22: Synthese der Hydrazone **52**



	R =	
<b>52a</b>	Br	
<b>52c</b>	-CN	
<b>52d</b>	CF <sub>3</sub>	

Schema 5-23:      Synthese der 2-Azapauillone **3**

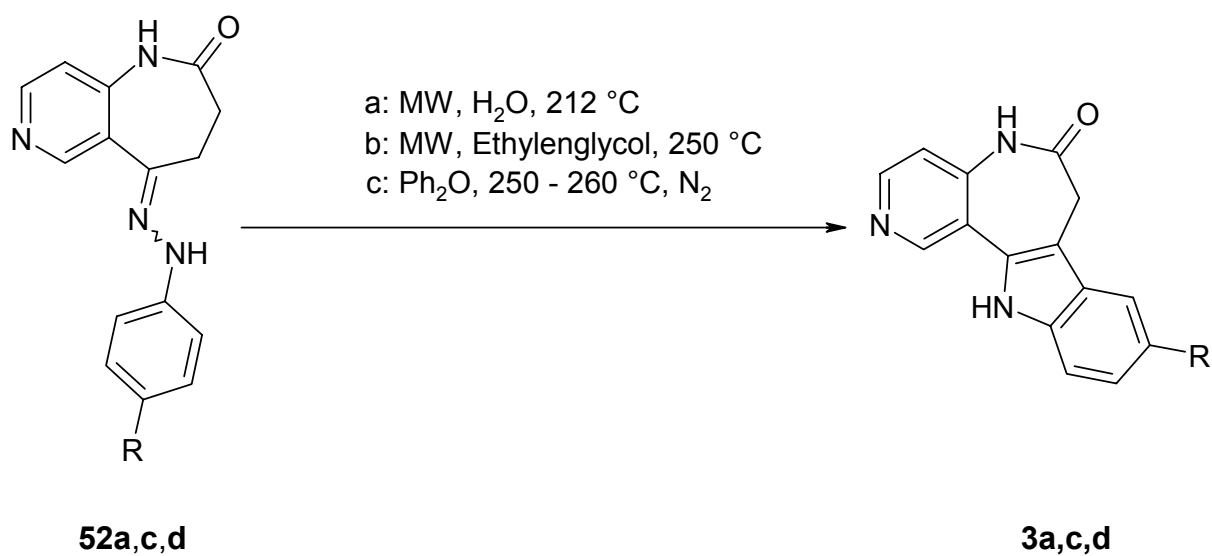
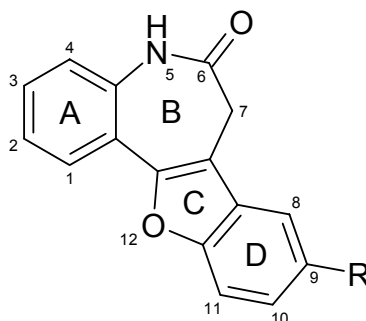


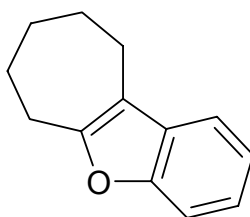
Tabelle 5-2:      Thermische Fischer-Indolsynthese der 2-Azapauillone **3**

Methode	R=	Hydrazon	Reaktionsmedium	Ausbeute an <b>3</b>
<b>a</b>	Br	<b>52a</b>	Wasser	1 %
<b>b</b>	-CN	<b>52c</b>	Ethylenglycol	-
<b>c</b>	-CN	<b>52c</b>	Diphenylether	6 %
<b>c</b>	CF <sub>3</sub>	<b>52d</b>	Diphenylether	8 %

### 5.3 Synthese von in Position 9 substituierten 5,7-Dihydro-6*H*-[1]benzofuro[3,2-*d*]benzazepin-6-onen

**4**

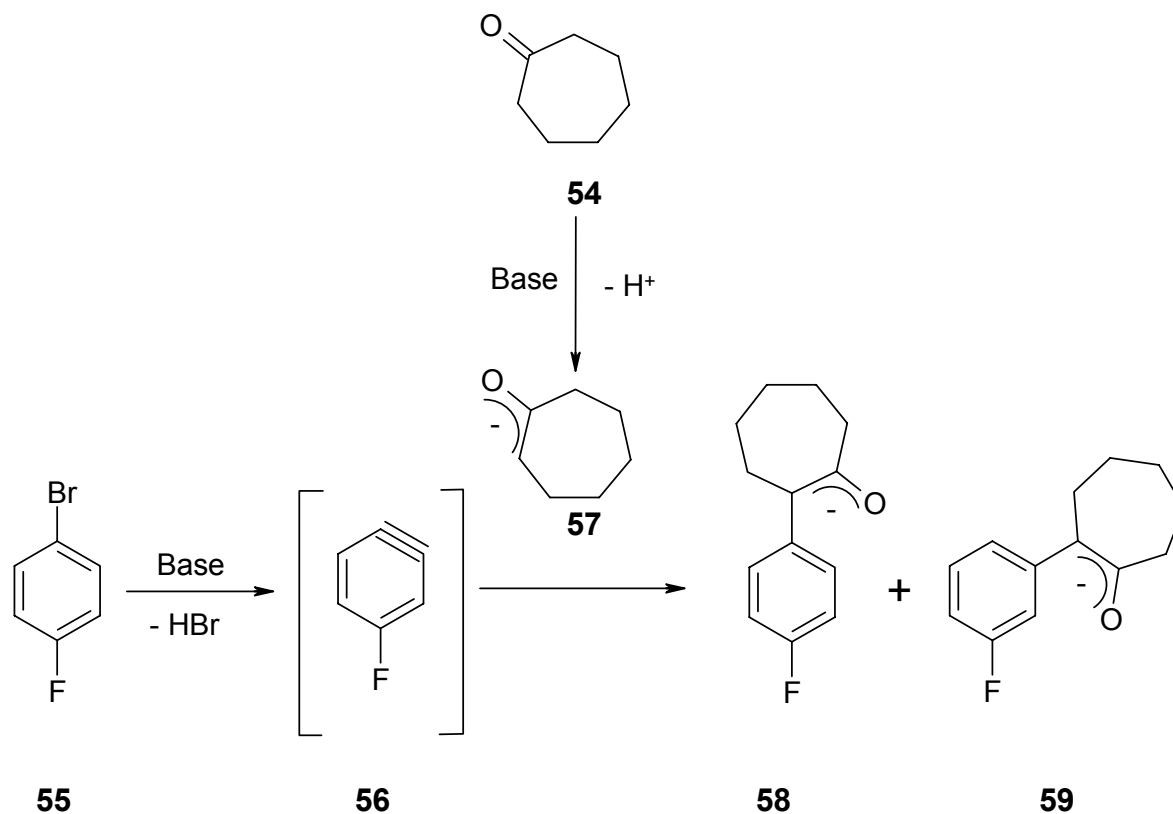
Ausgehend von der bekannten Struktur des 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**46**) sollte der Aufbau des unbekannten Ringsystems der 5,7-Dihydro-6*H*-[1]benzofuro[3,2-*d*]benzazepin-6-one erfolgen. In der Literatur sind verschiedene Methoden aufgeführt, um Benzofuran-Strukturen zu erzeugen.<sup>171</sup> Für einen ersten Überblick wurden Vorschriften betrachtet, die den Aufbau von trizyklischen Systemen (analog der Ringe B, C und D im 5,7-Dihydro-6*H*-[1]benzofuro[3,2-*d*]benzazepin-6-on) betreffen. Zwei Publikationen beschreiben die Synthese des 7,8,9,10-Tetrahydro-6*H*-benzo[*b*]cyclohepta[*d*]furans (**53**).

**53**

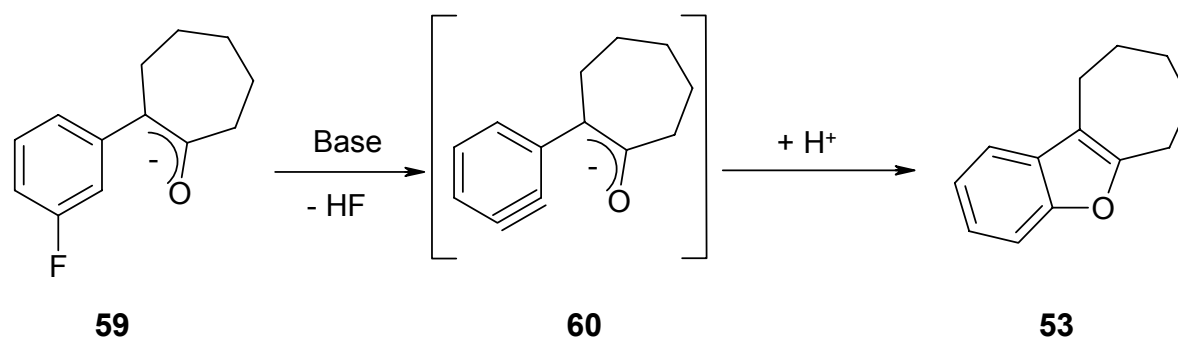
Bachelet und Caubere beschreiben die Umsetzung von Cycloheptanon (**54**) mit 1-Brom-4-fluorbenzol (**55**) in Gegenwart der Basen Natriumamid und Natrium-*tert*-butanolat. Bei dieser Reaktion wird zunächst das Arin **56** gebildet, das dann unter den basischen Bedingungen durch Cycloheptanolat (**57**) angegriffen wird. Dabei kann es zur Ausbildung des *ipso* (**58**)- oder *cine* (**59**)-Zwischenprodukts kommen

(Schema 5-24). Die folgende Eliminierung von Fluorwasserstoff erzeugt eine weitere Arin-Zwischenstufe (**60**), die nach erneutem Angriff des Enolats das Endprodukt **53** bildet (Schema 5-25).<sup>172</sup>

Schema 5-24: C-C-Verknüpfung eines Dihalogenbenzols mit Cycloheptanon über einen Arin-Mechanismus



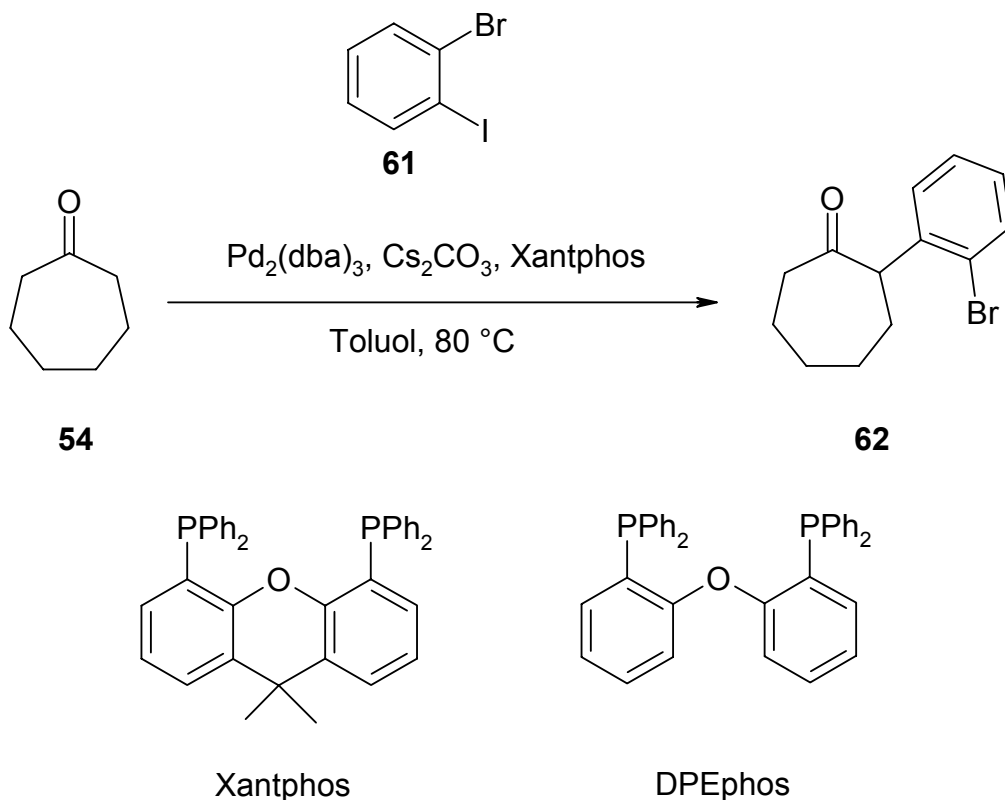
Schema 5-25: Ringschluss über einen Arin-Mechanismus zu **52**



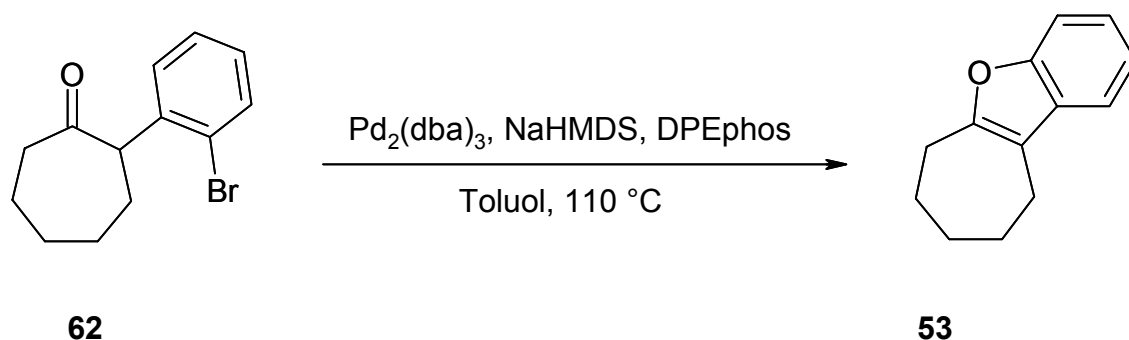


Die zweite Methode zur Darstellung von **53** verfolgt eine Palladium-katalysierte C-O-Verknüpfung zwischen einem Enolat und einem *ortho*-Dihalogenaromaten. Zunächst wird **53** mit 2-Bromiodbenzol (**61**) in Gegenwart von Dipalladium(0)-tris(dibenzylidenacetone) ( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ ), Xantphos und Cäsiumcarbonat in Toluol zu **62** umgesetzt (Schema 5-26). Die anschließende O-Arylierung erfolgt unter modifizierten Bedingungen: Als Ligand findet DPEphos Verwendung und zur Abstraktion des Protons wird die starke Base Natriumhexamethyldisilazan ( $\text{NaHMDS}$ ) verwendet (Schema 5-27).<sup>173</sup>

Schema 5-26: Palladium-katalysierte C-C-Verknüpfung zwischen einem Dihalogenbenzol und Cycloheptanon



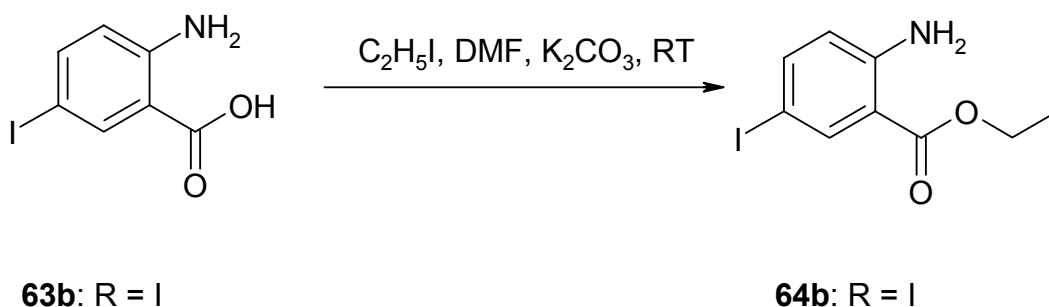
**Schema 5-27:** Palladium-katalysierter Ringschluss zu **53**



Ein möglicher Transfer der vorgestellten Methoden auf das 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**) birgt verschiedene Schwierigkeiten. Beide Varianten gehen von dem, im Vergleich zu **46a**, einfach aufgebauten Cycloheptanon aus. Die Lactam-Funktion von **46a** hätte unter den stark alkalischen Bedingungen der ersten Methode deprotoniert werden können, so dass dort zuvor eine Schutzgruppe hätte eingeführt werden müssen. Gleiches gilt für den O-Arylierungsschritt der zweiten Methode, wo ebenfalls eine starke Base (Natriumhexamethyldisilazan) Verwendung findet. Weitere Einschränkungen, was die Vielfalt der erzeugbaren Verbindungen angeht, werden durch die limitierte Anzahl an verfügbaren Halogenbenzol-Verbindungen hervorgerufen. Ein zusätzlicher Substituent im Ring D einer Zielverbindung würde eine weitere Substitution des einzusetzenden Dihalogenbenzols bedingen. Die Auswirkungen dieses zusätzlichen Substituenten auf die Synthese an sich lassen sich nur schwer abschätzen, jedoch kann diese zusätzliche Komponente weitere Komplikationen bergen.

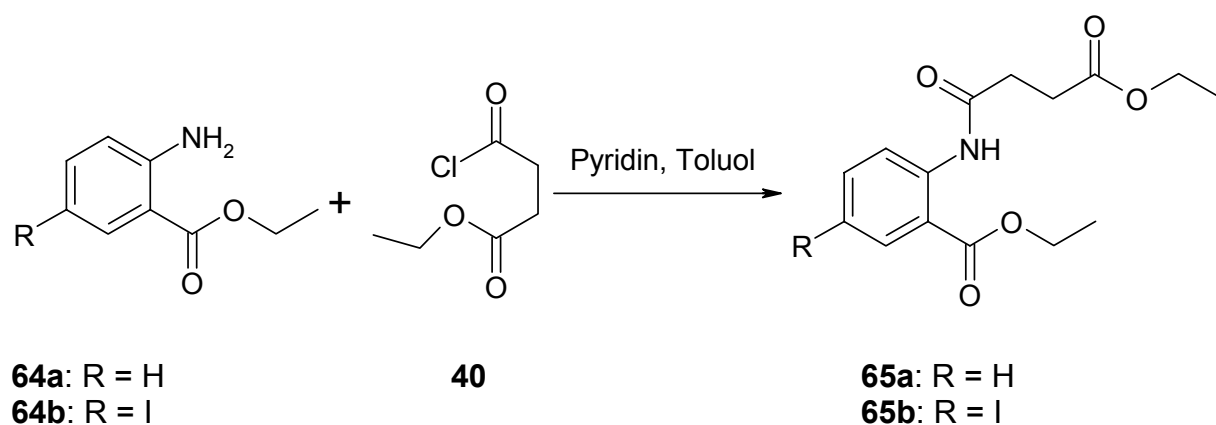
Aus den genannten Gründen wurde die Anwendbarkeit einer weiteren Methode untersucht. Verschiedene Publikationen berichten über die Darstellung von Benzo[*b*]furanen mittels einer vorgeschalteten Synthese eines O-Aryloximes und dessen säurekatalysierter [3,3]-sigmatroper Umlagerung. Diese Methode ähnelte der zuvor beschriebenen Azapaullon-Synthese in einigen Abschnitten. Parallelen stellen die Kondensation zum Hydrazone bzw. Oxim und der anschließende [3,3]-sigmatrope Ringschluss zu den Zielstrukturen dar. Dieses Konzept schien viel versprechend und ist in der nachfolgenden Reaktionsführung dargestellt.

Schema 5-28: Veresterung von **63b**

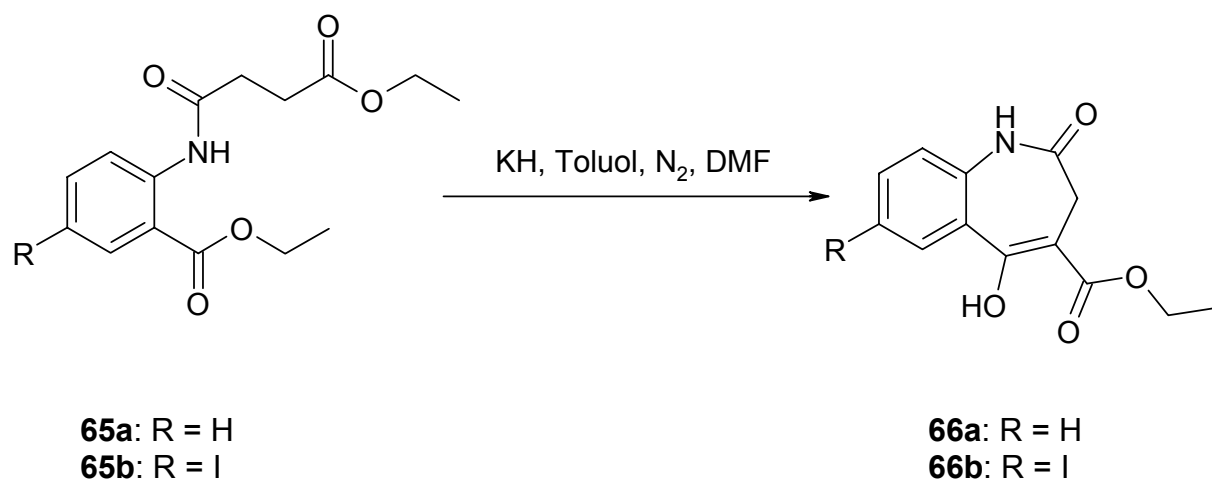


Der Ester **64a** bzw. **64b** wurde mit Bernsteinsäureethylesterchlorid in Gegenwart der Hilfsbase Pyridin acyliert (Schema 5-29). Die dabei entstehenden Verbindungen 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]benzoesäureethylester (**65a**) und 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-iodbenzoesäureethylester (**65b**) wurden nachfolgend mit Hilfe von Kaliumhydrid in Toluol ringgeschlossen (Schema 5-30). Die erzeugten Derivate **66a** und **b** konnten dann in wässrigem DMSO bei 150 °C unter Stickstoffbegasung dealkoxycarbonyliert werden (Schema 5-31). Die Zielstrukturen **46a** und **b** dienten dann als Edukte für die weiteren sich anschließenden Reaktionen.

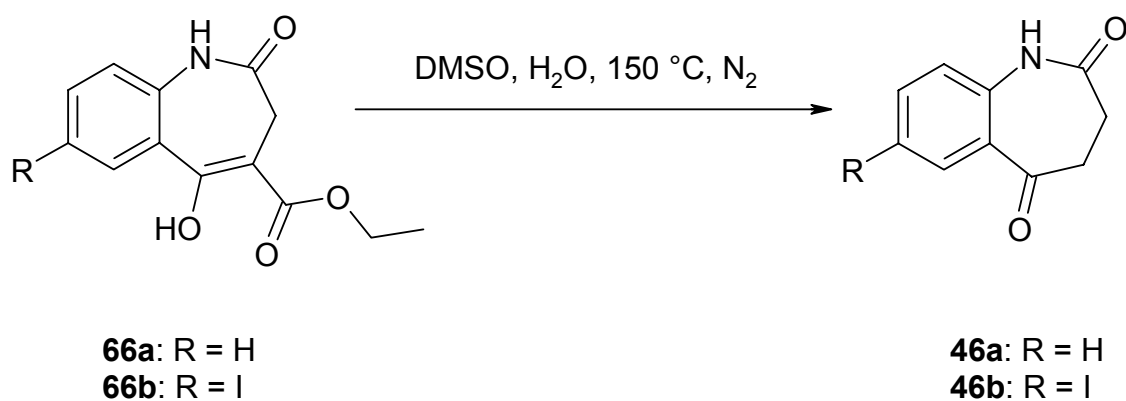
**Schema 5-29:** Die Acylierung der Aminofunktionen führt zu **65a** und **b**



**Schema 5-30:** Dieckmann-Esterkondensation von **65a** und **b**



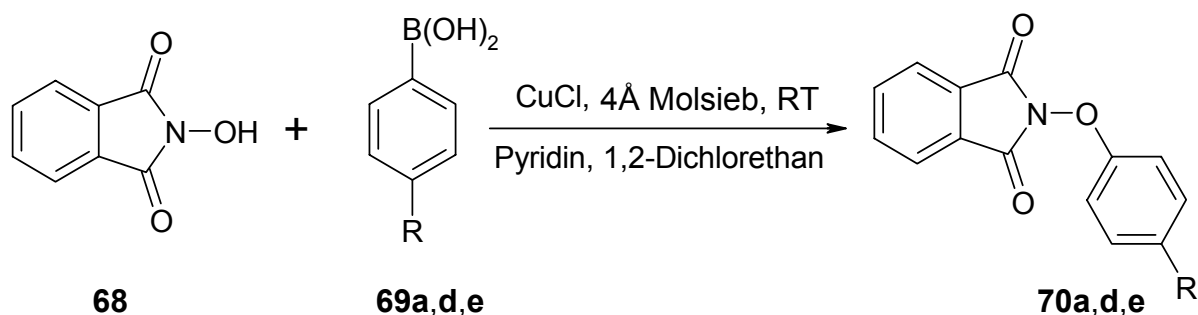
**Schema 5-31:** Dealkoxycarbonylierung von **66a** und **b**



### 5.3.2 Synthese von O-Arylhydroxylamin-Hydrochloriden

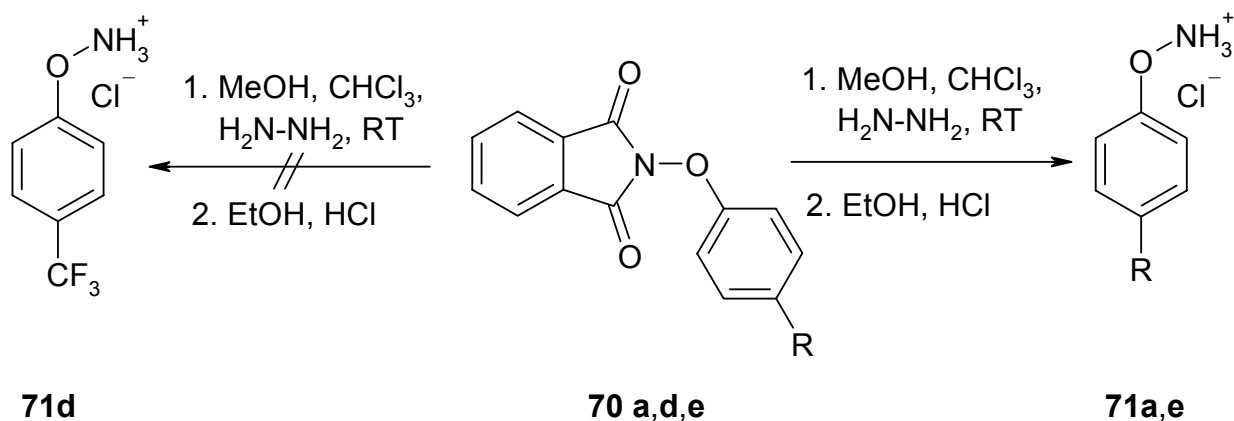
Die spätere Umsetzung von **46a** zu den entsprechenden Oximen setzte eine effiziente Synthese der O-Arylhydroxylamine voraus, da die substituierten O-Phenylhydroxylamin-Hydrochloride **67a** und **b** im Gegensatz zum unsubstituierten **67d** kommerziell nicht erhältlich waren. Diese Verbindungen wurden durch eine Kupfer(I)-chlorid induzierte Kupplungsreaktion mit anschließender Hydrazinolyse synthetisiert.<sup>175</sup> Dabei wurde N-Hydroxyphthalimid (**68**) mit geeigneten Phenylboronsäuren **69a-b** zu *p*-substituierten N-Phenoxyphthalimiden **70a-b** gekuppelt (Schema 5-32) und anschließend mit Hydrazin-Hydrat zu den entsprechenden O-Phenylhydroxylaminen (Schema 5-33) umgesetzt. Die Vorteile dieser Methode liegen in der breiten Anwendung. Neben verschiedenen *para*-substituierten- lassen sich auch *ortho*-substituierte Phenylboronsäuren kuppeln. Andere Methoden benötigen weitaus stärker toxische Reagenzien (z.B. Cr(CO)<sub>3</sub>-Komplexe),<sup>176</sup> oder führen erst nach mehreren Schritten zum gewünschten Produkt.<sup>177</sup> Die in Schema 5-32 dargestellte Kupplung erbrachte ähnliche Ausbeuten wie beschrieben,<sup>175</sup> doch nahm die vollständige Umsetzung eine deutlich längere Zeit in Anspruch (vgl. Experimenteller Teil). Die anschließende Hydrazinolyse verlief glatt, jedoch musste die Methode bei der Erzeugung der Hydrochloride abgewandelt werden. Anstatt das nach Säulenchromatographie (SC) erhaltene Öl in Ether aufzunehmen und mit einem Gemisch aus 1,4-Dioxan und 4 M Salzsäure auf pH 3 einzustellen, wurde das Öl mit 5 ml Ethanol und mit einer äquivalenten Menge konzentrierter Salzsäure versetzt und anschließend im Vakuum eingeeengt. Diese drastische Methode führte bei dem O-(4-Chlorphenyl)hydroxylamin und bei dem O-(4-Bromphenyl)hydroxylamin zu den gewünschten Hydrochloriden **71a** und **b**. Bei Anwendung auf das O-(4-Trifluormethylphenyl)hydroxylamin zersetzte sich selbiges unter den gewählten Bedingungen. Auch die sofortige Weiterverarbeitung durch Umsetzung der freien Base war nicht zielführend und stellte daher keine Alternative dar.

**Schema 5-32:** Kupplung zwischen *N*-Hydroxphthalimid **68** und den Boronsäuren **69**



	R =
<b>a</b>	Br
<b>d</b>	$\text{CF}_3$
<b>e</b>	Cl

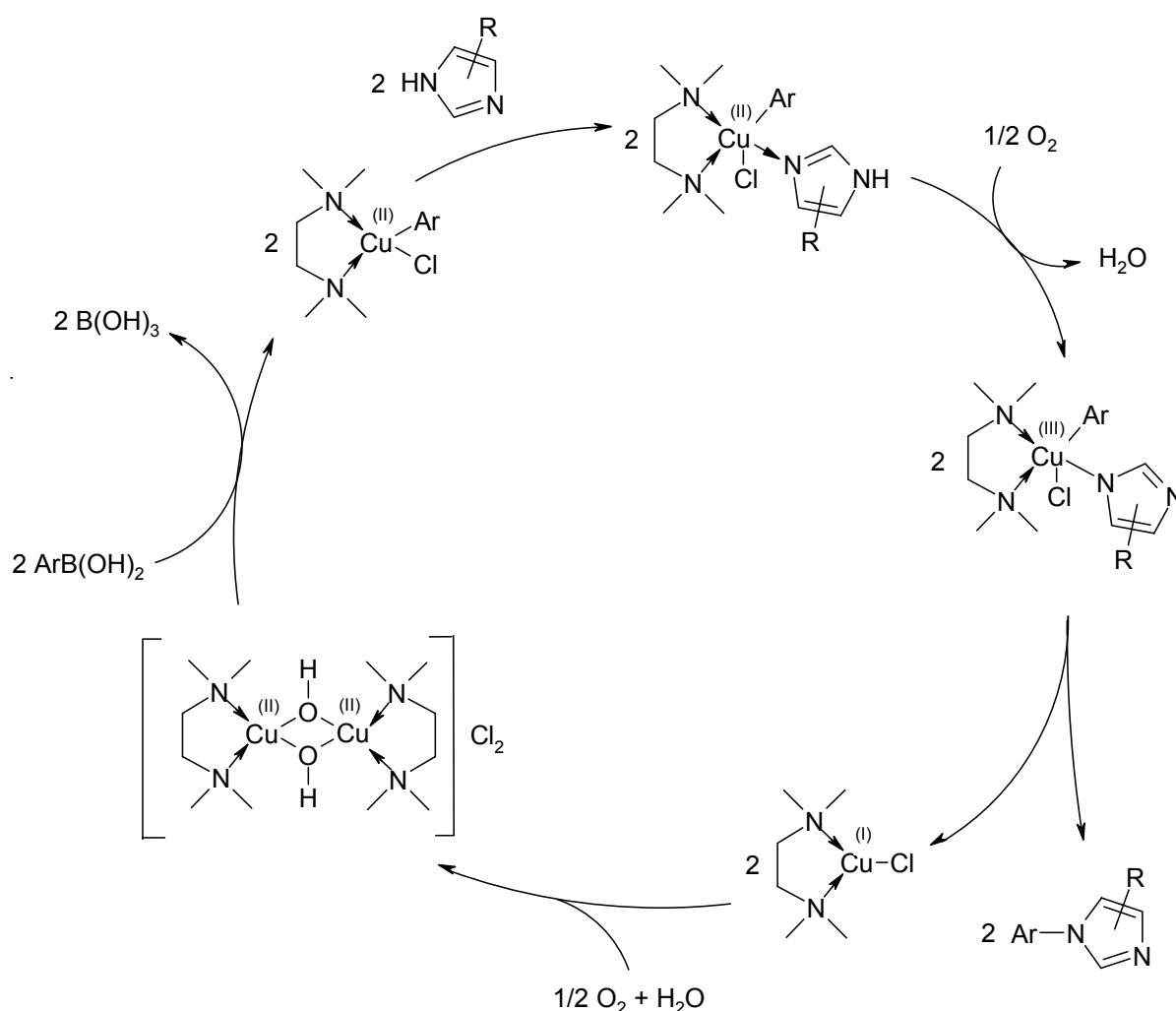
**Schema 5-33:** Hydrazinolyse von **70**



Interessanterweise verliefen diese Kupplungsreaktionen nicht wie üblich unter Schutzgas, sondern im geöffneten Kolben unter Atmosphärenbedingungen. Petrassi und Mitarbeiter berichten, dass unter Argon-Begasung schlechtere Ausbeuten zu erwarten sind, ebenso wenn man nicht getrocknete Lösungsmittel einsetzt.<sup>175</sup> Die bessere Reaktivität unter Luftzufuhr wird in zwei weiteren Veröffentlichungen<sup>178,179</sup> bestätigt. Collman stellt einen möglichen Reaktionszyklus für die Kupplung von Imidazol und verschiedenen Phenylboronsäuren auf (Schema 5-34).<sup>178</sup> Dabei

fungiert der Luftsauerstoff als Oxidationsmittel, welcher intermediär  $\text{Cu}^+$  über die Stufe des  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{3+}$  oxidiert. Dies wird als mögliche Begründung für die bessere Reaktivität in Gegenwart von Luftsauerstoff angeführt. Gleichzeitig führen diese Bedingungen zur Bildung von Peroxid-Spezies, die den Abbau der Phenylboronsäuren verursachen. Um ausreichende Umsetzung zu erhalten, wurden deswegen zwei Äquivalente Phenylboronsäure eingesetzt<sup>175</sup> (siehe Experimenteller Teil).

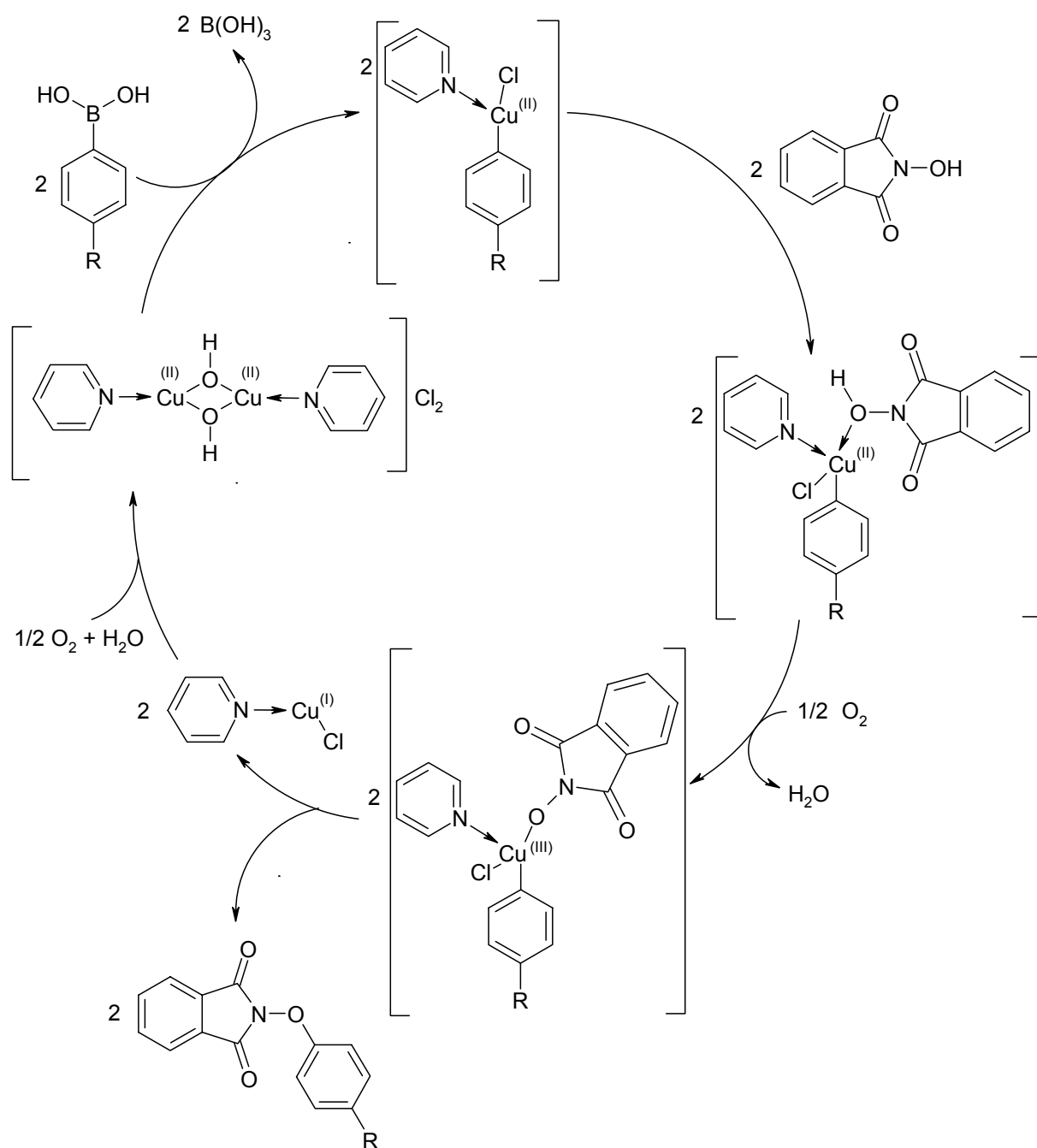
**Schema 5-34:** Reaktionszyklus der Kupplung zwischen Arylboronsäuren und Imidazol (nach Collman)<sup>178</sup>



In Schema 5-35 ist der Reaktionszyklus auf die durchgeführte Kupplung von *N*-Hydroxyphthalimid mit Phenylboronsäuren übertragen worden. Dabei handelt es sich lediglich um ein Postulat, gerade hinsichtlich der Tatsache, dass Petrassi

äquivalente Mengen an Kupfer(I)-chlorid einsetzt,<sup>175</sup> während Collman und Mitarbeiter nur katalytische Mengen verwenden.<sup>178</sup> Der Reaktionszyklus in Schema 5-34 berücksichtigt diese Tatsache nicht, auch hier wird das Kupfer(I)-chlorid zurückgewonnen.

**Schema 5-35:** Postulierter Reaktionszyklus zwischen Arylboronsäuren und *N*-Hydroxyphthalimid<sup>a</sup>



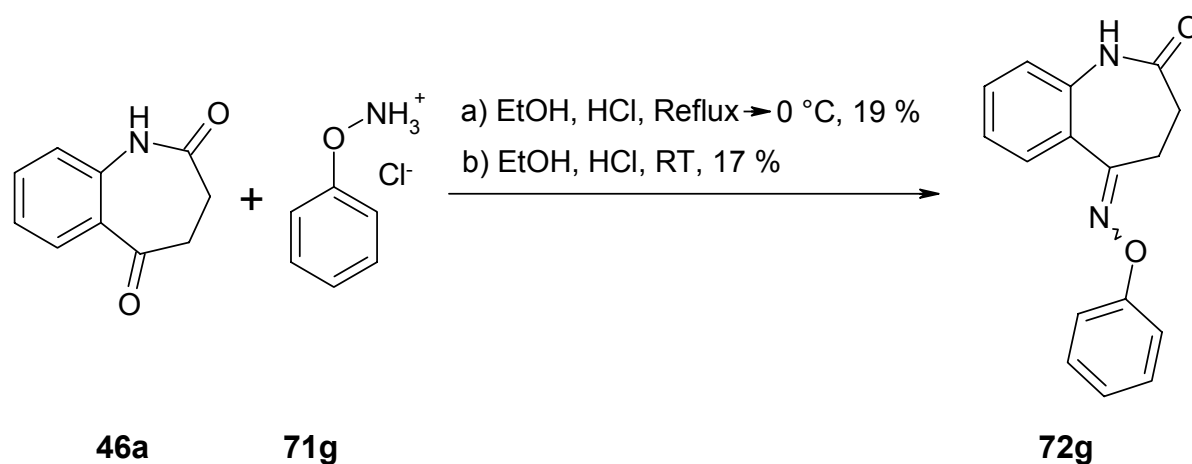
<sup>a</sup> in Anlehnung an den Reaktionszyklus von Collman<sup>178</sup> postulierten Mechanismus



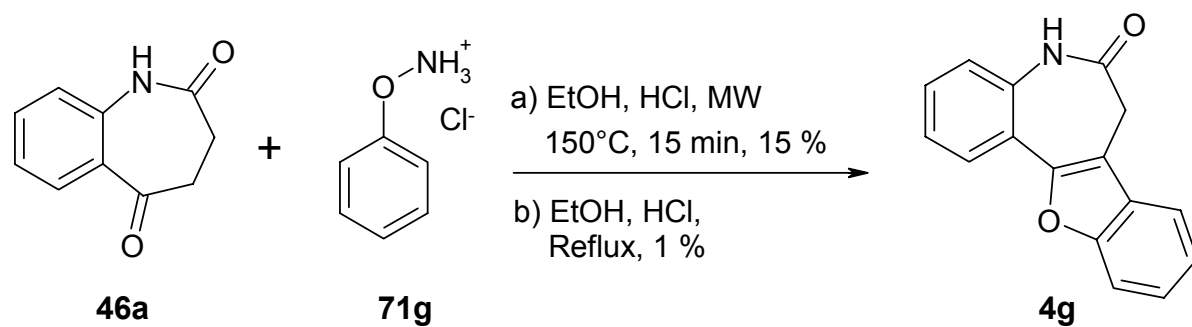
### 5.3.3 Synthese der 12-Oxapaulone

Die oben geschilderten Synthesesequenzen führten zum 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**) und zu den *O*-Arylhydroxylamin-Hydrochloriden **71a** und **e**, die nun in einer sich anschließenden Synthese zur Reaktion gebracht werden sollten. Zunächst sollte in einer Kondensation das entsprechende Oxim gebildet werden. Um die optimalen Reaktionsbedingungen herauszufinden, wurde **46a** mit *O*-Phenylhydroxylamin-Hydrochlorid (**71g**) unter verschiedenen Bedingungen zum 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-(5-*O*-phenyloxim) (**72g**) umgesetzt. Castellino und Mitarbeiter beschreiben die Umsetzung verschiedener Ketone mit *O*-Arylhydroxylaminen in trockenem Ethanol unter Katalyse von wenigen Tropfen konzentrierter Salzsäure. Dabei wird der Ansatz nur kurz bis zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf 0 °C kristallisieren die entsprechenden Oxime.<sup>180</sup> Die Anwendung dieser Methode auf die Reaktion von **46a** mit **71g** lieferte Produkt **72g** in 19-prozentiger Ausbeute (Schema 5-36, Methode a). Weitere Publikationen beschreiben die Synthese in modifizierten Formen: *O*-Phenylhydroxylamin wird mit einem geeigneten Keton oder Aldehyd in trockenem Ethanol unter Rückfluss umgesetzt<sup>181,182</sup> oder mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure über Nacht bei Raumtemperatur stengelassen.<sup>183</sup> Der Transfer der zweiten Methode auf die Umsetzung von **46a** mit **71g** führte zu einer 17-prozentigen Ausbeute von **72g** (Schema 5-36, Methode b). Beim Versuch, diese Synthese unter Reflux durchzuführen, wurde anstatt des Oxims **72g** das 5,7-Dihydro-6*H*-[1]-benzofuro[3,2-*d*][1]benzazepin-6-on (**4g**) mit einer Ausbeute von einem Prozent erhalten (Schema 5-37, Methode b). Diese Reaktion wurde anschließend bei 150 °C in der Synthesemikrowelle optimiert, was zu einer 15-prozentigen Ausbeute an **4g** führte (Schema 5-37, Methode a). Da die direkte Synthese der Zielverbindung **4g** aus den Edukten **46a** und **71g** nur geringe Ausbeuten lieferte, wurde die zweistufige Synthese optimiert. Ziel war es, das Oxim **71g** in höheren Ausbeuten zu isolieren und in einer nachfolgenden Reaktion ringzuschließen. Als erfolgreich erwies sich dabei das Erhitzen von **46a** und **71g** in Eisessig in Gegenwart von äquimolaren Mengen an Natriumacetat, was zu einer 55-prozentigen Ausbeute von **72g** führte (Schema 5-38). Diese Reaktion ließ sich auch mit den *para*-substituierten *O*-Arylhydroxylaminhydrochloriden **71a** und **e** durchführen (Schema 5-38).

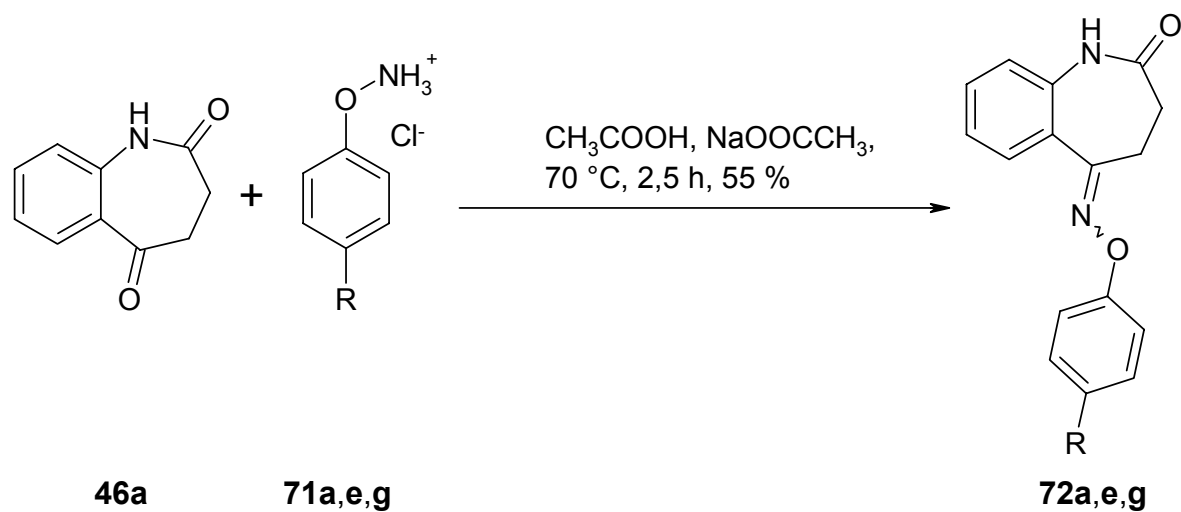
Schema 5-36:      Synthese des Oxims **72g** in Ethanol



Schema 5-37:      Direkte Umsetzung von **46a** und **71g** zum 12-Oxapauillon **4g**

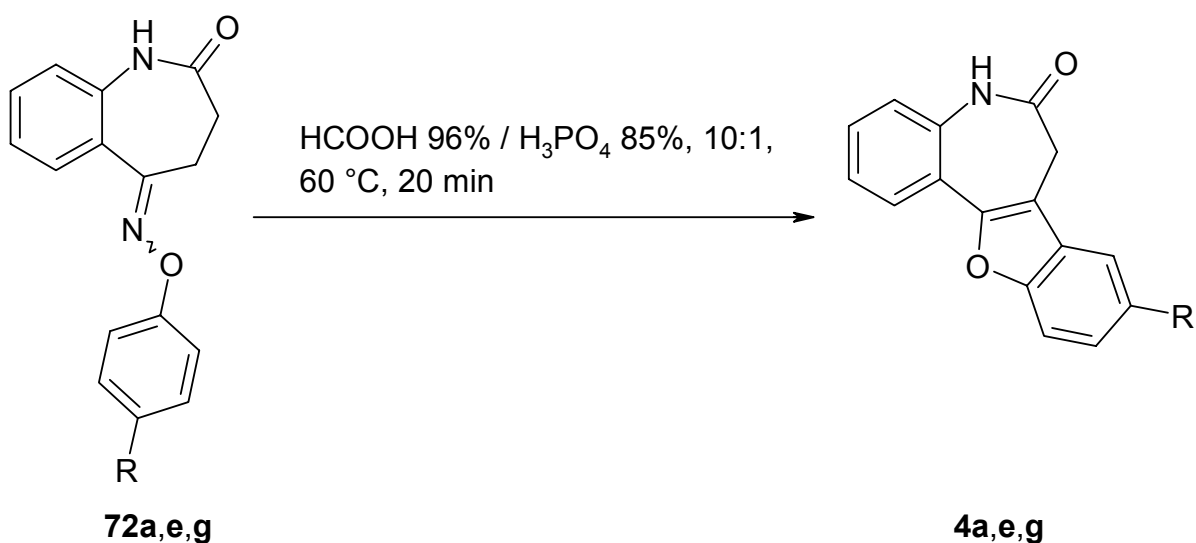


Schema 5-38:      Synthese der Oxime **72** in Eisessig



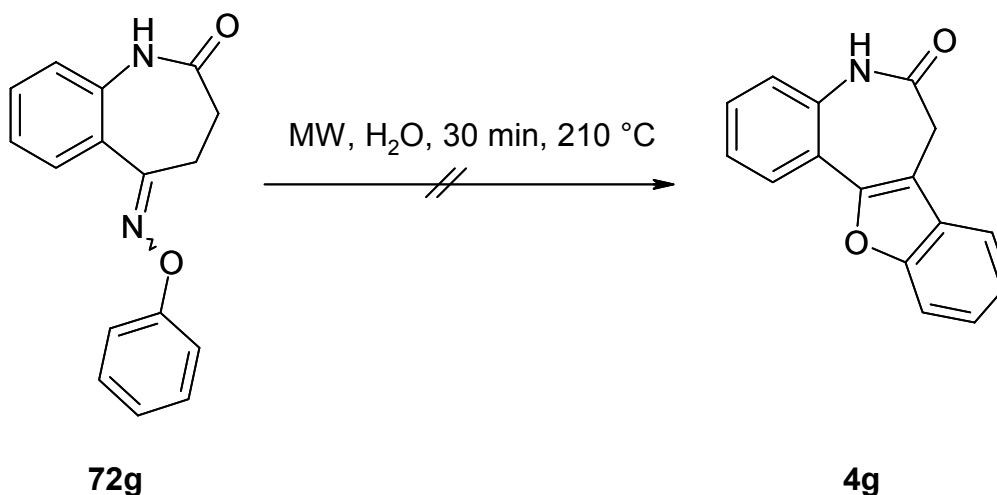
Für die Umsetzung des Oxims **72g** zu dem Benzofuran-Derivat **4g** wurden verschiedene Synthesemöglichkeiten in Betracht gezogen.<sup>180,181,182,184</sup> Die von Castellino und Mitarbeitern vorgeschlagene Methode, Oxime in Ameisensäure/Phosphorsäure im Verhältnis 10:1 bei 60 °C zu den gewünschten Benzofuranen umzusetzen,<sup>180</sup> führte ausgehend von den Oximen **72** zu den gewünschten 12-Oxapaulonen **4** (Schema 5-39). Bei den Oximen strukturverwandten Hydrazonen gelang wie oben erwähnt ein Ringschluss zum entsprechenden Indol mit Hilfe der thermisch induzierten Fischer-Indolsynthese in NCW. Versuche, diese Reaktionsführung auch auf das Oxim **72g** anzuwenden, führten nicht zur Zielstruktur **4g**, sondern zu einem Gemisch von verschiedenen Produkten, die mittels Dünnschichtchromatographie (DC) detektiert, aber nicht isoliert werden konnten (Schema 5-40).

Schema 5-39: Ringschluss zu den 12-Oxapaulonen **4**



	R =
<b>a</b>	Br
<b>e</b>	Cl
<b>g</b>	H

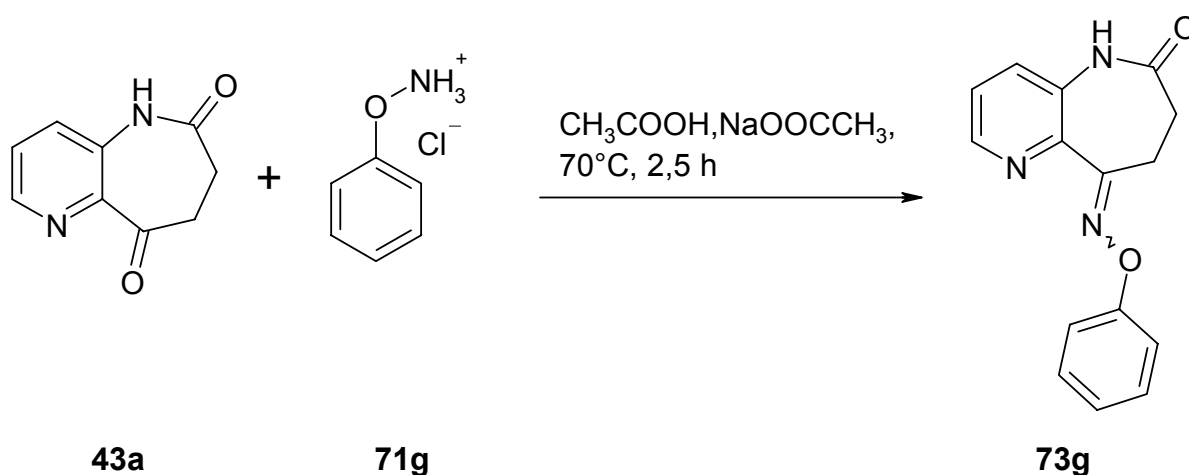
**Schema 5-40:** Versuch der Darstellung von **4g** in NCW



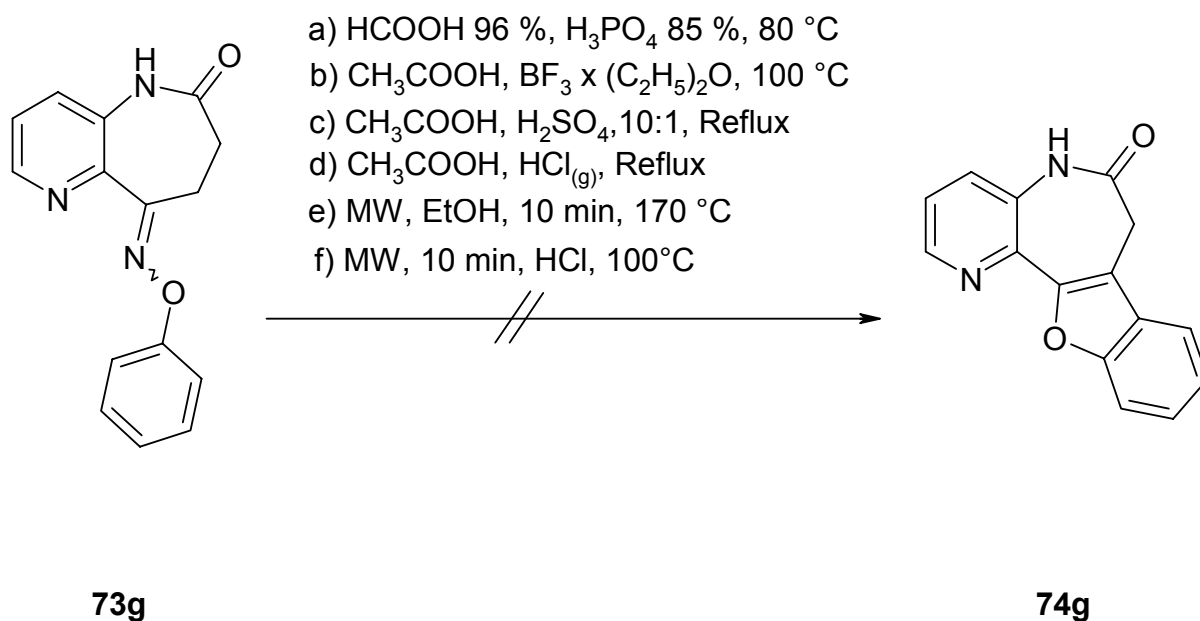
#### 5.3.4 Syntheseveruche zur Darstellung von 5,7-Dihydro-6H-[1]benzofuro[2,3-d]pyrido[3,2-b]azepin-6-on

In Analogie zur Synthese der Verbindungen **72g** und **4g** wurde auch die Darstellung der 1-Aza-Analoga **74** angestrebt. In Eisessig reagierte das 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**43a**) mit **71g** bei 60 °C zu dem entsprechenden 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion-(O-phenyloxim) **73g** in 56-prozentiger Ausbeute (Schema 5-41). Auch hier wurde ein Ringschluss zum 5,7-Dihydro-6H-[1]benzofuro[2,3-d]pyrido[3,2-b]azepin-6-on (**74g**) versucht. Doch weder das Erhitzen von **73g** in einem Gemisch aus Ameisensäure und Phosphorsäure,<sup>180</sup> noch die Umsetzung in Gegenwart von Bortrifluorid-diethyletherat in trockenem Eisessig<sup>181</sup> führten zum gewünschten Produkt. Die Anwendung drastischerer Bedingungen, wie das Refluxieren von **73g** in einer Mischung aus Eisessig und Schwefelsäure, war ebenso erfolglos wie das Einleiten von Chlorwasserstoffgas in eine Lösung von **73g** in Eisessig und anschließendes Erhitzen unter Rückfluss (Schema 5-42, Methoden a-d). Alternativ wurde versucht, die Reaktion thermisch zu induzieren. Da dies bei dem Oxim **72g** in NCW nicht gelang, wurde **73g** in der Synthese-Mikrowelle bei 170 °C in Ethanol erhitzt. Wiederum war kein Produkt isolierbar, auch eine weniger drastische Methode (100 °C, katalytische Mengen konzentrierter Salzsäure) führte nur zur Zurückgewinnung von 25 % des eingesetzten Edukts (Schema 5-42, Methoden e und f).

Schema 5-41:      Synthese des Oxims **73g**



Schema 5-42:      Versuche zur Darstellung von 5,7-Dihydro-6*H*-[1]benzofuro[2,3-*d*]pyrido[3,2-*b*]azepin-6-on (**74g**)

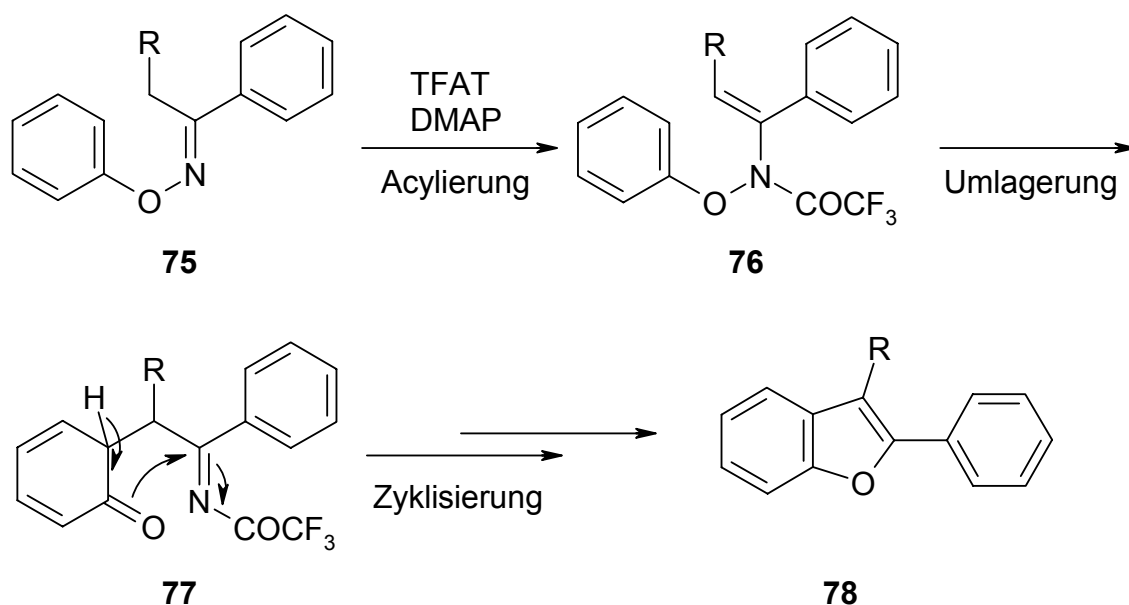


Miyata und Mitarbeiter berichten von einer Benzofuransynthese unter Anwendung starker Acylierungsreagenzien.<sup>185,186</sup> Dabei wird das Oxim **75** zunächst am Stickstoff acyliert. Das Zwischenprodukt **76** lagert sich zu **77** um und zyklisiert zum Benzofuranderivat **78**. Dabei wird ein gemischtes Anhydrid aus Trifluormethansulfonsäure und Trifluoressigsäure (TFAT)<sup>187</sup> und eine geeignete Hilfsbase in Dichlormethan (DCM) oder Acetonitril (ACN) verwendet (Schema 5-43).

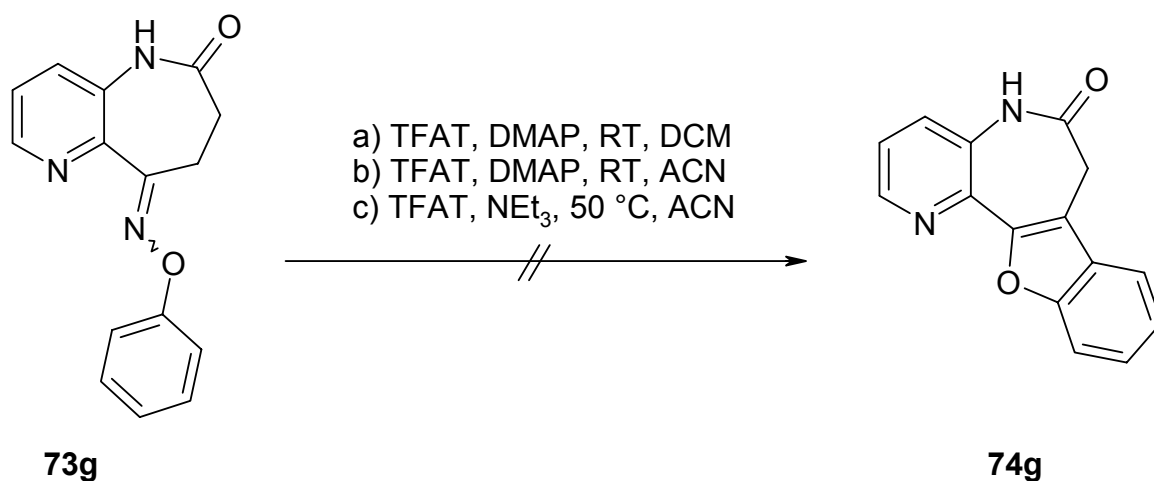
Versuche, diese Methode auf die Zyklisierung von **73g** anzuwenden, schlugen fehl. Weder der Einsatz der Hilfsbasen Triethylamin ( $\text{NEt}_3$ ) oder 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), noch der Wechsel der Lösungsmittel oder Anheben der Reaktionstemperatur führte zum gewünschten Produkt (Schema 5-44, Methoden a-c).

Schema 5-43: Benzofuran-Synthese mit TFAT nach Miyata<sup>186</sup>

TFAT:  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{SO}_2\text{CF}_3$

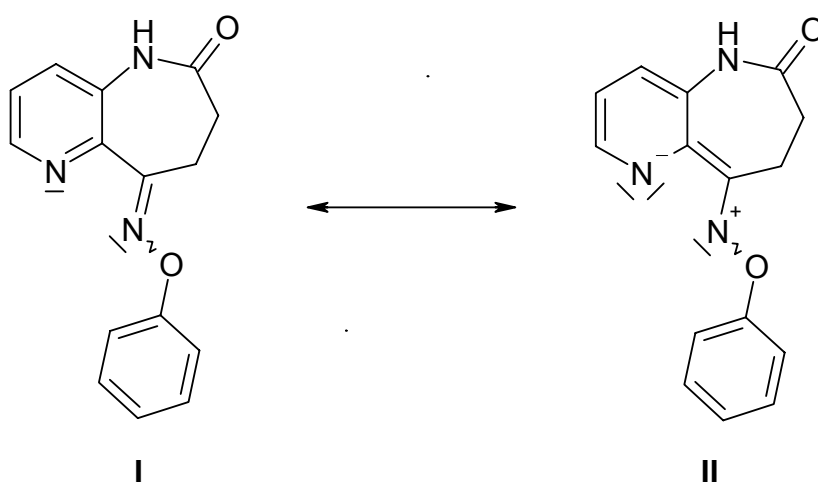


Schema 5-44: Versuche zur Darstellung von **74g** mittels TFAT

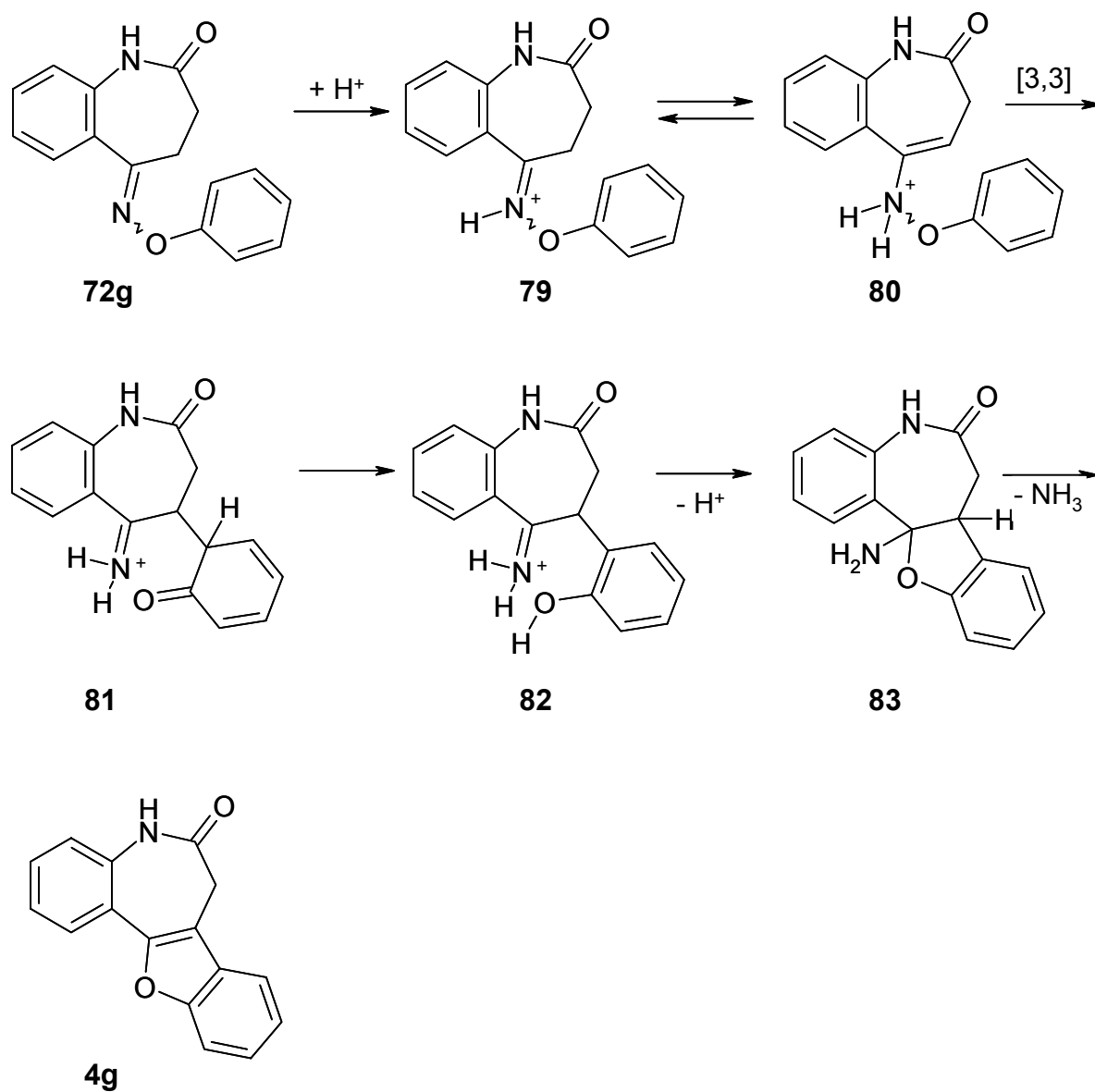


Die mangelnde Reaktivität von **73g** basiert auf der vergleichsweise elektronenarmen Pyridin-Partialstruktur. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus geht von der Protonierung des Oximstickstoffs aus (Zwischenstufen **79** und **80**). Nach der [3,3]-sigmatropen Umlagerung führt die Abspaltung von Ammoniak über die Intermediate **81** - **83** zum Zielprodukt **4g** (Schema 5-46). Betrachtet man die mesomeren Grenzstrukturen von **73g**, so fällt auf, dass eine Protonierung bzw. Acylierung am Oxim-Stickstoff durch die Nachbarschaft zum elektronenziehenden Pyridin-Stickstoff erschwert ist (Schema 5-45).

Schema 5-45: Mesomere Grenzstrukturen von **73g**



**Schema 5-46:** Mechanismus der Benzo[*b*]furan-Synthese am Beispiel von **4g**  
(modifiziert nach Mooradian<sup>184</sup>)

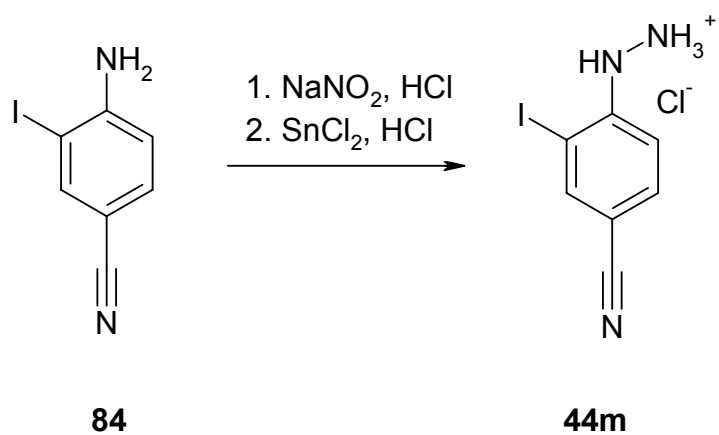




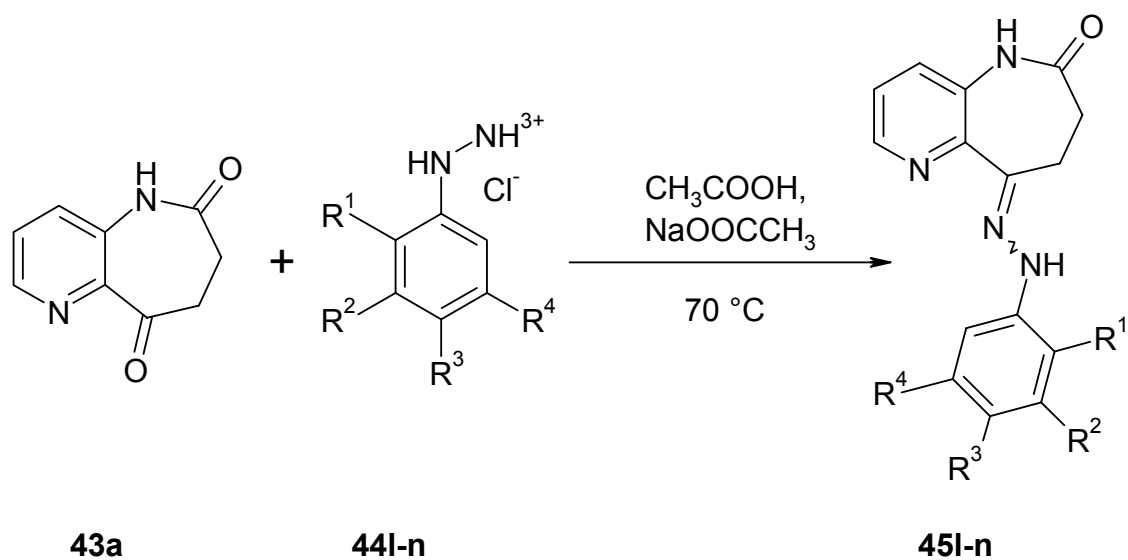
## 5.4 Synthese von 9,11- sowie 8,10- disubstituierten 7,12- Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-onen

Wie in Abschnitt 4.4.5 beschrieben, sollten 9,11-disubstituierte Paullone synthetisiert werden. Um die räumlichen Gegebenheiten zu explorieren, wurden zwei sterisch unterschiedlich anspruchsvolle Substituenten eingeführt. Dazu wurde die zuvor beschriebene 1-Azapauillon-Synthese eingesetzt (Schemata 5-10 und 5-12). **43a** wurde mit einem disubstituierten Phenylhydrazinderivat zum entsprechenden Hydrazon umgesetzt (Schema 5-48), das dann wiederum durch thermisch-induzierte Fischer-Indolsynthese ringgeschlossen werden sollte (Schema 5-49). Bei der Fischer-Indolsynthese von *ortho*-substituierten Phenylhydrazonen kann es zu einer Verschiebung des *ortho*-Substituenten kommen.<sup>188</sup> Verschiedene Beispiele sind literaturbekannt, dieses Phänomen tritt auch bei Halogensubstituenten auf.<sup>189</sup> Schultz beschreibt die Synthese des 1-Carba-Analogons von **2l** ausgehend von **46a** und 2,4-Difluorphenylhydrazin in Eisessig unter Katalyse von Schwefelsäure.<sup>190</sup> Dabei wird ein nicht auftrennbares Gemisch des erwarteten 9,11-Difluor-indolo[3,2-*d*][1]benzazepinon und einem Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinon mit verschobener Stellung des Halogen-Substituenten erhalten. Das Protonen-NMR-Spektrum deutete dabei auf ein Verhältnis von 3:1 hin. Unter den in Schema 5-49 dargestellten Bedingungen trat diese Verschiebung nicht auf. Bei beiden *ortho*- und *para*-substituierten Hydrazonen **45l** und **m** wurden die entsprechenden 9,11-disubstituierten Zielstrukturen **2l** und **m** erhalten, was im nachfolgenden Abschnitt für **2l** exemplarisch belegt wurde. Für das Hydrazin bzw. dessen Hydrochlorid **44m** wurde zunächst eine Synthese etabliert, die auf einer Vorschrift basierte, die 4-Aminobenzonitril zu 4-Hydrazinobenzonitril umsetzt.<sup>191</sup> Durch Anwendung dieser Vorschrift auf 4-Amino-3-iodbenzonitril konnte das bisher nicht charakterisierte 4-Hydrazino-3-iodbenzonitril-Hydrochlorid (**44m**) dargestellt werden (Schema 5-47).

Schema 5-47:

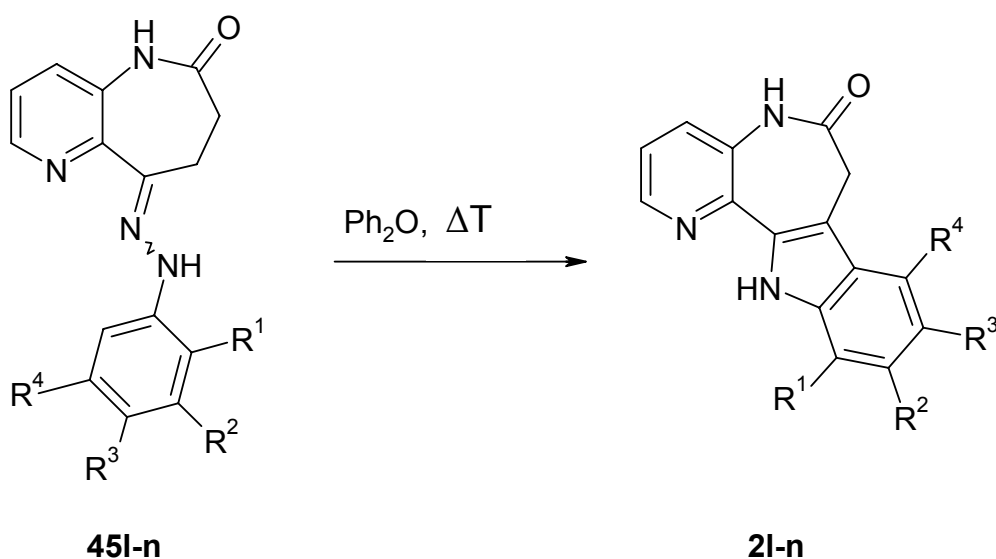


Schema 5-48:

Darstellung der Hydrazone **45l-n**

	$\text{R}^1 =$	$\text{R}^2 =$	$\text{R}^3 =$	$\text{R}^4 =$
<b>l</b>	F	H	F	H
<b>m</b>	I	H	-CN	H
<b>n</b>	H	Cl	H	Cl

Schema 5-49: Ringschluss zu den Zielstrukturen **2l-n**



#### 5.4.1 Zur Strukturaufklärung von **2l**

Um die Positionierung der Fluor-Substituenten in **2l** eindeutig zu belegen und deren potenzielle synthesebedingte Verschiebung auszuschließen, wurden verschiedene NMR-Experimente durchgeführt. Aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum konnten die Signale H-2, H-4, H-5, H-7 und H-12 durch Vergleich mit Angaben aus der Literatur eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 5-4 und Tabelle 5-3). Mit der Aufdehnung des Bereichs von  $\delta = 7,50 - 7,00$  ppm war es möglich, die noch ausstehenden Signale den Kernen H-3, H-8 und H-10 zuzuordnen. Bei den Signalen, die bei  $\delta = 7,50 - 7,45$  ppm auftreten, handelt es sich um zwei ineinanderfallende AMX-Spinsysteme (wobei  $J_{\text{AX}} < J_{\text{AM}}$ ), deren Kopplungskonstanten mit  $J = 9,4/2,0$  Hz und  $J = 8,4/4,6$  Hz bestimmt wurden und als Dublett von Dubletts (dd) aufspalten. Die Konstanten des letzteren Signals deuteten auf eine Kopplung mit den Kernen H-2 und H-4 hin, so dass das Signal bei  $\delta = 7,45$  ppm dem Kern H-3 zugeordnet werden konnte. Bei dem Signal, das bei  $\delta = 7,06$  ppm beobachtet wurde, handelt es sich um ein  $\text{AB}_2\text{C}$ -Spinsystem, welches als Dublett von Dubletts von Dubletts (ddd) aufspaltet. Es ließen sich drei Kopplungskonstanten bestimmen, wobei es sich um zwei  $^1\text{H} - ^{19}\text{F}$ -Kopplungen und eine  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ -Kopplung handelte. Die Größe der Kopplungskonstanten deutete auf zwei  $^3J_{\text{H,F}}$ -Kopplungen und eine  $^4J_{\text{H,H}}$ -Kopplung hin, womit das Signal H-10 zugeordnet werden konnte. Das verbliebene dd wurde

durch H-8 erzeugt. Die beobachteten Konstanten ( $J = 9,4/2,0$  Hz) deuteten auf Kopplungen mit F-9 und H-10 hin (Abbildung 5-5).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sprachen für eine 9,11-Difluor-Substitution des Paullon-Grundgerüsts. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass ein ähnliches Protonen-Spektrum ebenfalls von einem etwaigen strukturisomeren 8,10-Difluor-substituierten Derivat zu erwarten war. Abschließende Klärung dieses Zusammenhangs sollte über H,C-Korrelation mittels HSQC und HMBC erfolgen. Zunächst wurden dafür das  $^{13}\text{C}$ -NMR- und dessen DEPT-Spektrum ausgewertet. Letzteres wies ein sekundäres C-Atom sowie fünf tertiäre C-Atome auf, die eindeutig den entsprechenden Kohlenstoffatomen zugeordnet werden konnten. Das sekundäre C-Atom entsprach der Methylen-Brücke im Azepin-Ring (C-7,  $\delta = 32,6$  ppm), die tertiären Atome mit der Verschiebung  $\delta = 144,4$  ppm,  $129,6$  ppm und  $123,1$  ppm konnten durch Vergleich mit Pyridin<sup>192</sup> C-2, C-4 und C-3 zugeordnet werden (Abbildung 5-6a). Durch die unterschiedliche Größe der Kopplungskonstanten der als dd aufspaltenden Signale bei  $\delta = 99,5$  und  $98,0$  ppm wurden diese den tertiären Kohlestoffen C-8 und C-10 zugeordnet. Dabei wies C-8 eine  $^2J$ -Kopplung zwischen C-8 und F-9 und eine  $^4J$ -Kopplung zwischen C-8 und F-11 auf. Die direkte Nachbarschaft zu F-9 und F-11 resultiert in zwei  $^2J$ -Kopplungen für das Kohlenstoffatom C-10 (Abbildung 5-6d). Aus dem Übersichtsspektrum in Abbildung 5-6b lässt sich ebenfalls das Singulett für das Carbonyl-Kohlenstoffatom C-6 bei  $\delta = 170,1$  ppm zuordnen. Die Dehnung im tiefen Feld des Verschiebungsbereichs kennzeichnet die Signallagen der Kohlenstoffe C-9 und C-11. Deren Vergleich mit den entsprechenden relativen Signalverschiebungen von C-5 und C-7 in  $1H$ -Indol<sup>192</sup> deuten daraufhin, dass C-9 das Signal bei  $\delta = 155,9$  ppm und C-11 das dd bei  $\delta = 148,3$  ppm erzeugt (Abbildung 5-6a).

Tabelle 5-3: Vergleich spektroskopischer Daten von **2l** und Referenzsubstanzen

Kern in <b>2l</b>			Referenz			
Position	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)	Struktur	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)	Quelle
H-2	8,51	$^3J_{H2-3} = 4,5$ $^4J_{H2-4} = 1,5$	H-2, Pyridin	8,59	$^3J_{H2-3} = 6,0$ $^4J_{H2-4} = 1,9$	192
H-3	7,45	$^3J_{H3-4} = 8,4$ $^3J_{H3-2} = 4,6$	H-3, Pyridin	7,25	$^3J_{H3-4} = 7,6$ $^3J_{H3-2} = 6,0$	192
H-4	7,64	$^3J_{H4-3} = 8,2$ $^4J_{H4-2} = 1,4$	H-4, Pyridin	7,75	$^3J_{H4-3} = 7,6$ $^4J_{H4-2} = 1,9$	192
H-5	10,26	-	1-Carba- Analogon von <b>2b</b>	10,08	-	55
H-7	3,66	-	1-Carba- Analogon von <b>2b</b>	3,50	-	55
H-8	7,49	$^3J_{H8-F9} = 9,4$ $^4J_{H8-10} = 2,0$	H-4, 5,7-Difluor- 1 <i>H</i> -indol	6,82	$^3J_{H4-F5} = 9,1$ $^4J_{H4-6} = 2,2$	193
H-10	7,06	$^3J_{H10-F11} = 11,1$ $^3J_{H10-F9} = 9,6$ $^4J_{H10-8} = 2,0$	-	-	-	-
H-12	12,27	-	1-Carba- Analogon von <b>2b</b>	11,67	-	55

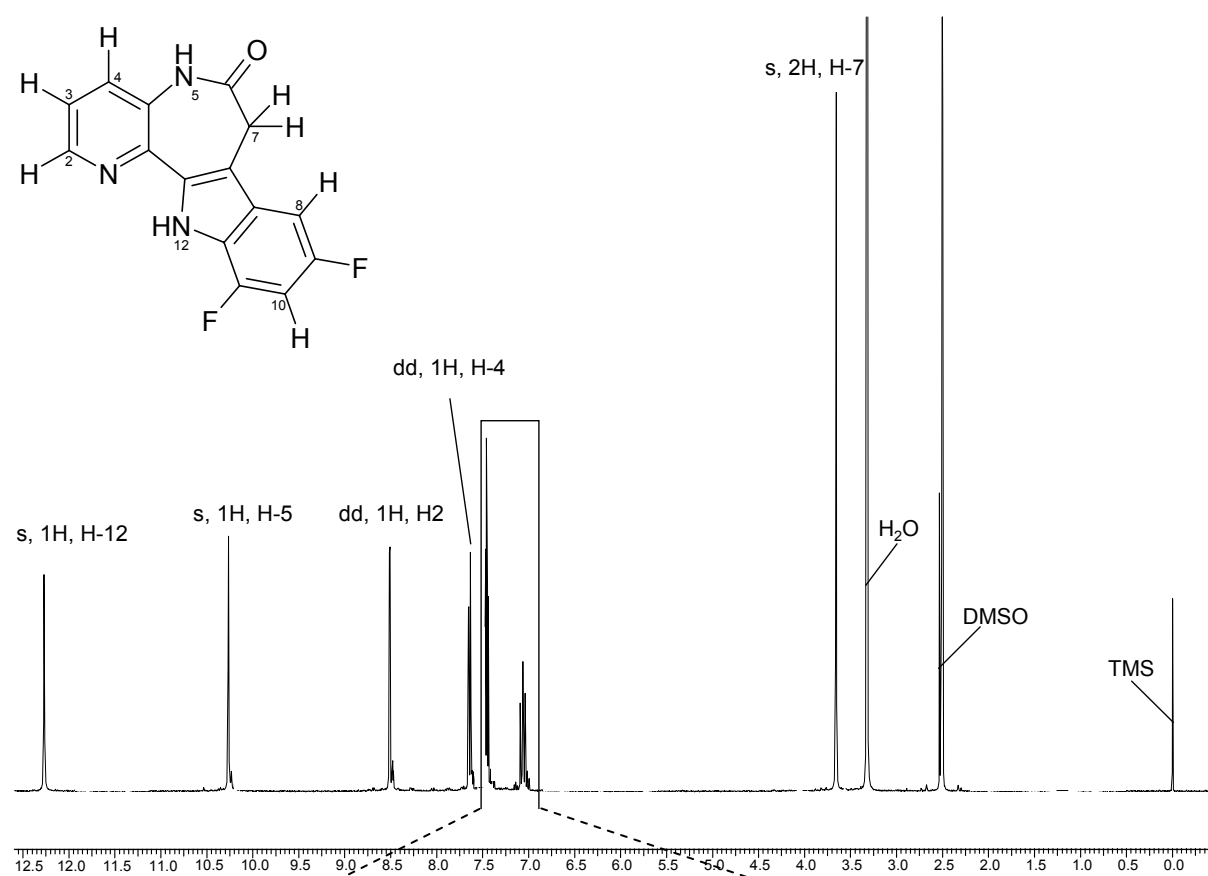
Abbildung 5-4: Protonenübersichtsspektrum von **2I**

Abbildung 5-5:

Kopplungsmuster der Protonen H-3, -8 und -10

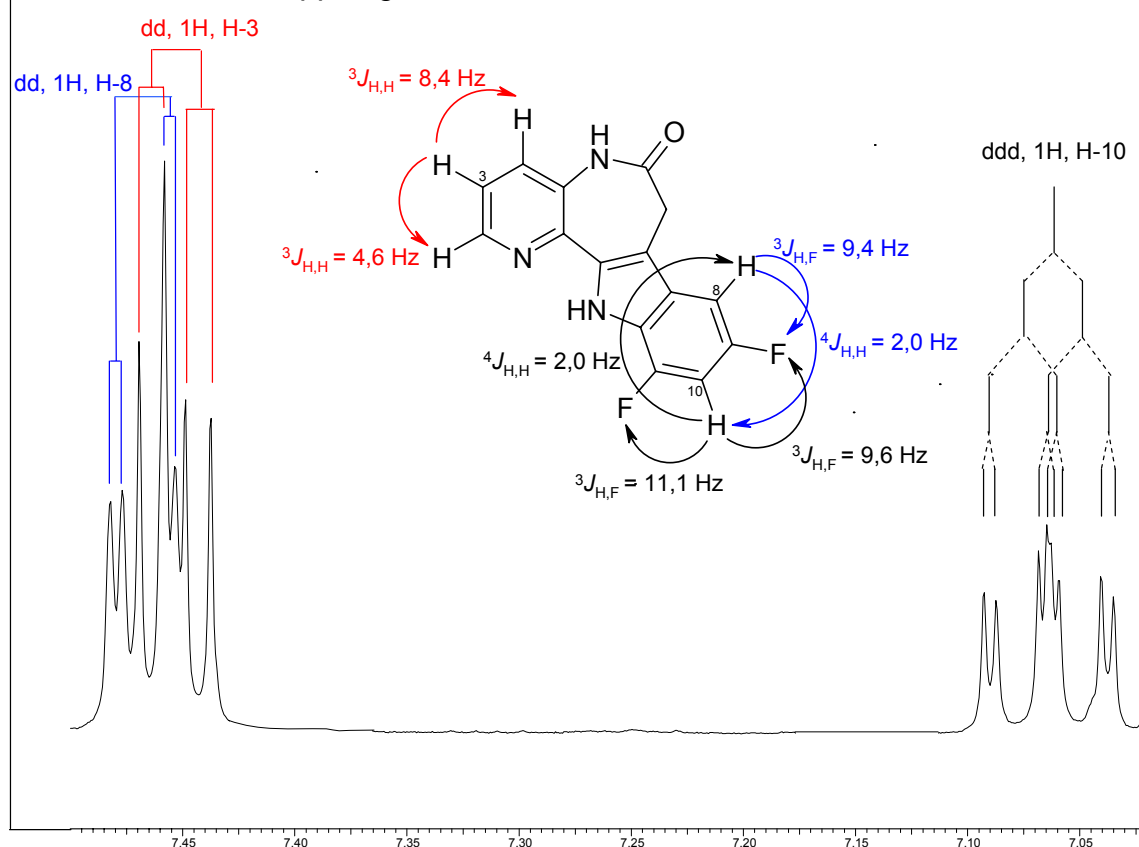
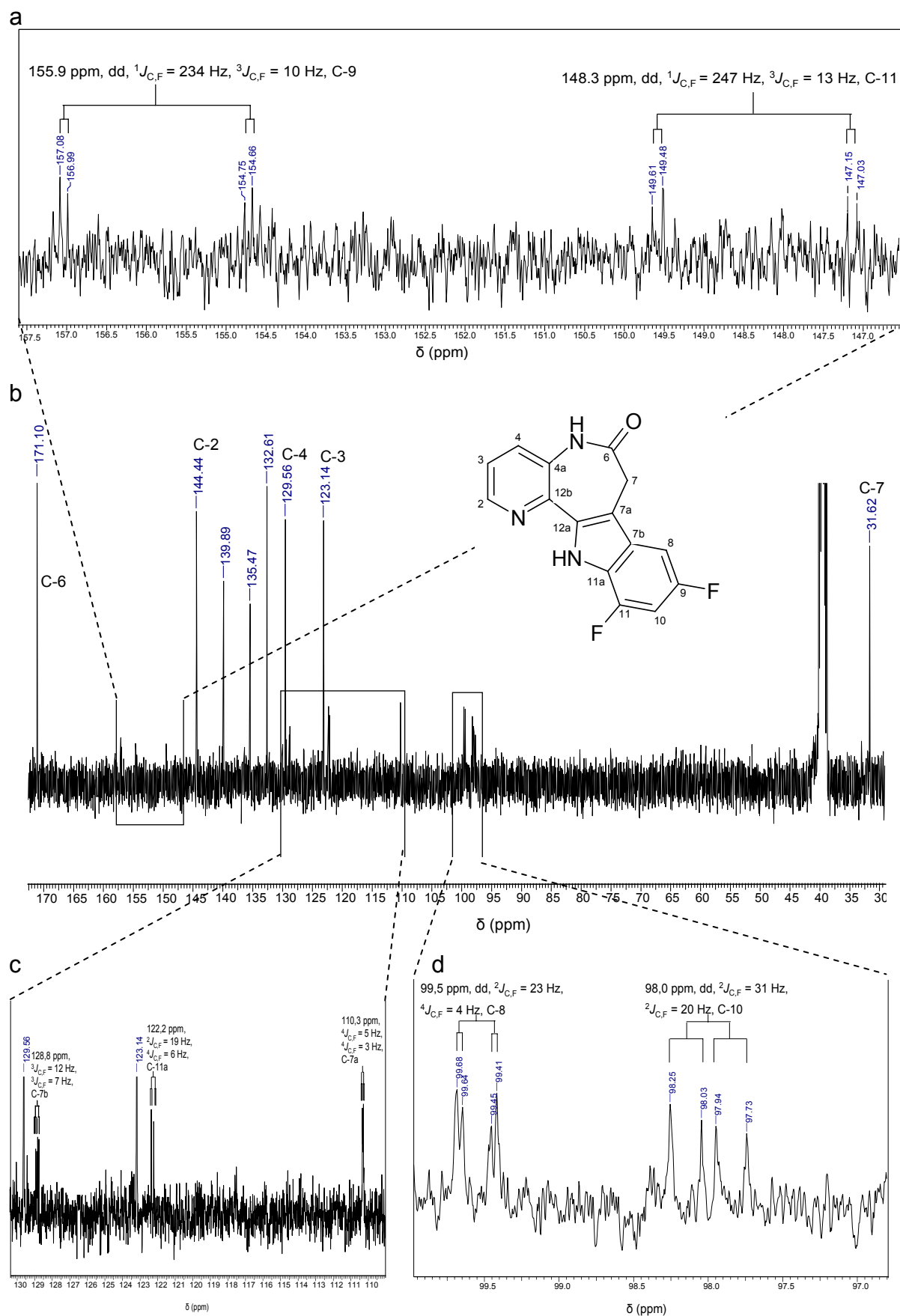
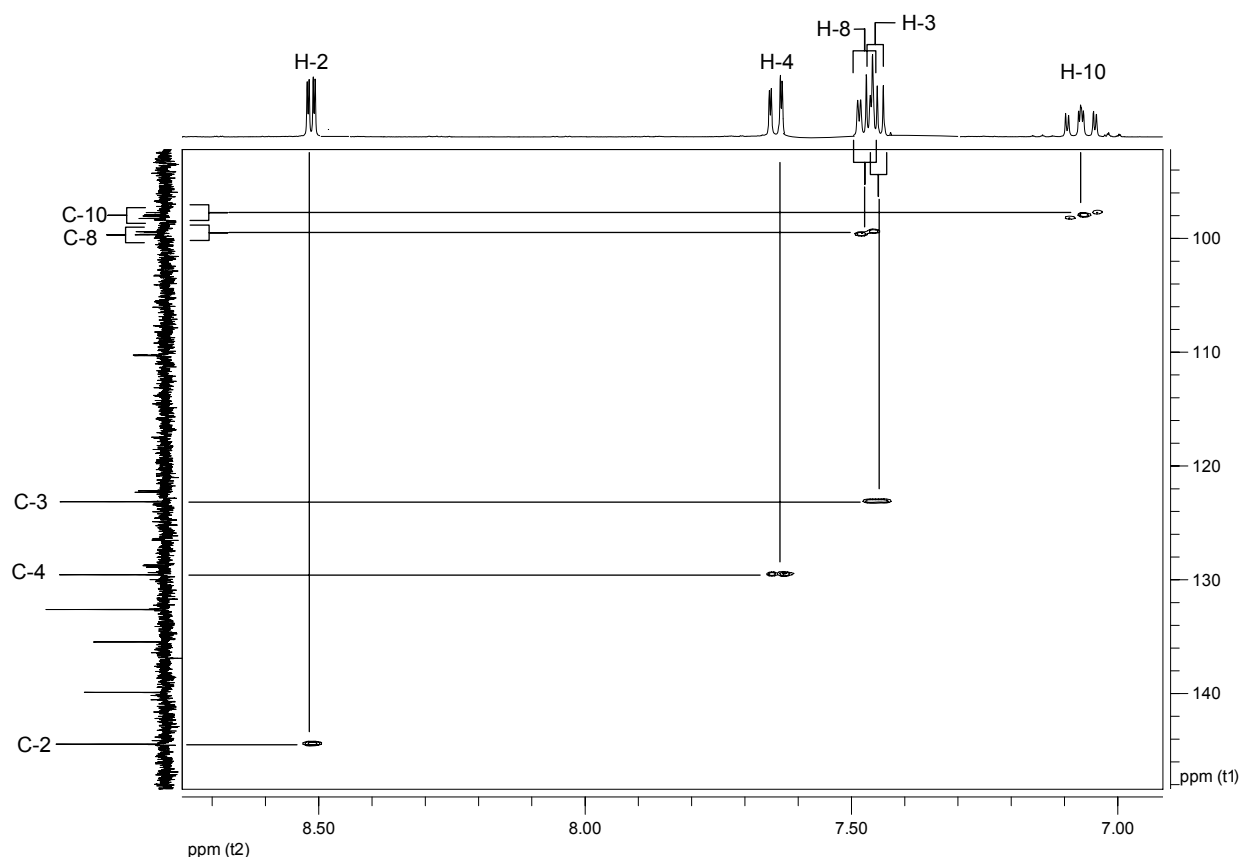


Abbildung 5-6:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **2l**

Die in Abbildung 5-7 dargestellte H,C-HSQC verifiziert die angenommene Konnektivität, die aufgrund der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten postuliert wurde. HSQC ermöglicht die Korrelation über eine Bindung, somit konnten die fünf aromatischen Protonensignale eindeutig den fünf tertiären Kohlenstoffatomen zugeordnet werden. Ausgehend von dieser gesicherten Datenlage konnte nun mittels H,C-HMBC die Konnektivität und Position der quartären Kohlenstoffatome aufgeklärt werden. Diese Technik erlaubt vor allem die Korrelation zwischen Protonen und  $^{13}\text{C}$ -Kernen über  $^3J$ -Kopplungen. Kopplungen über zwei Bindungen, seltener über 4 Bindungen werden ebenfalls in den Spektren beobachtet.<sup>194</sup> Auch Kopplungen über quartäre Kohlenstoffatome und Heteroatome werden durch diese Technik einer Auswertung zugänglich gemacht, wobei Signale von  $^1J$ -Kopplungen durch Filter unterdrückt werden.<sup>195</sup>

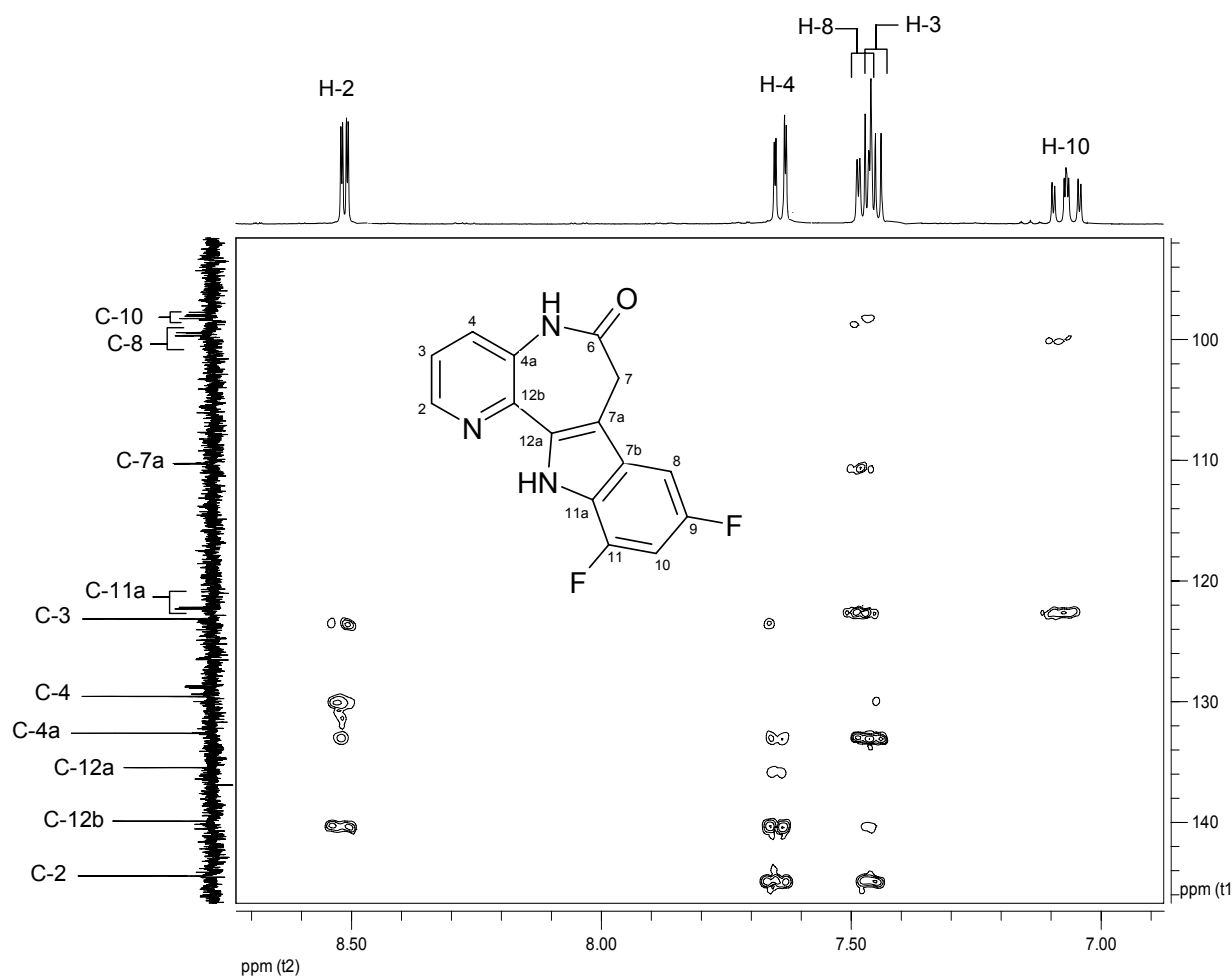
**Abbildung 5-7:** Ausschnitt des H,C-HSQC-Spektrums von **2I**





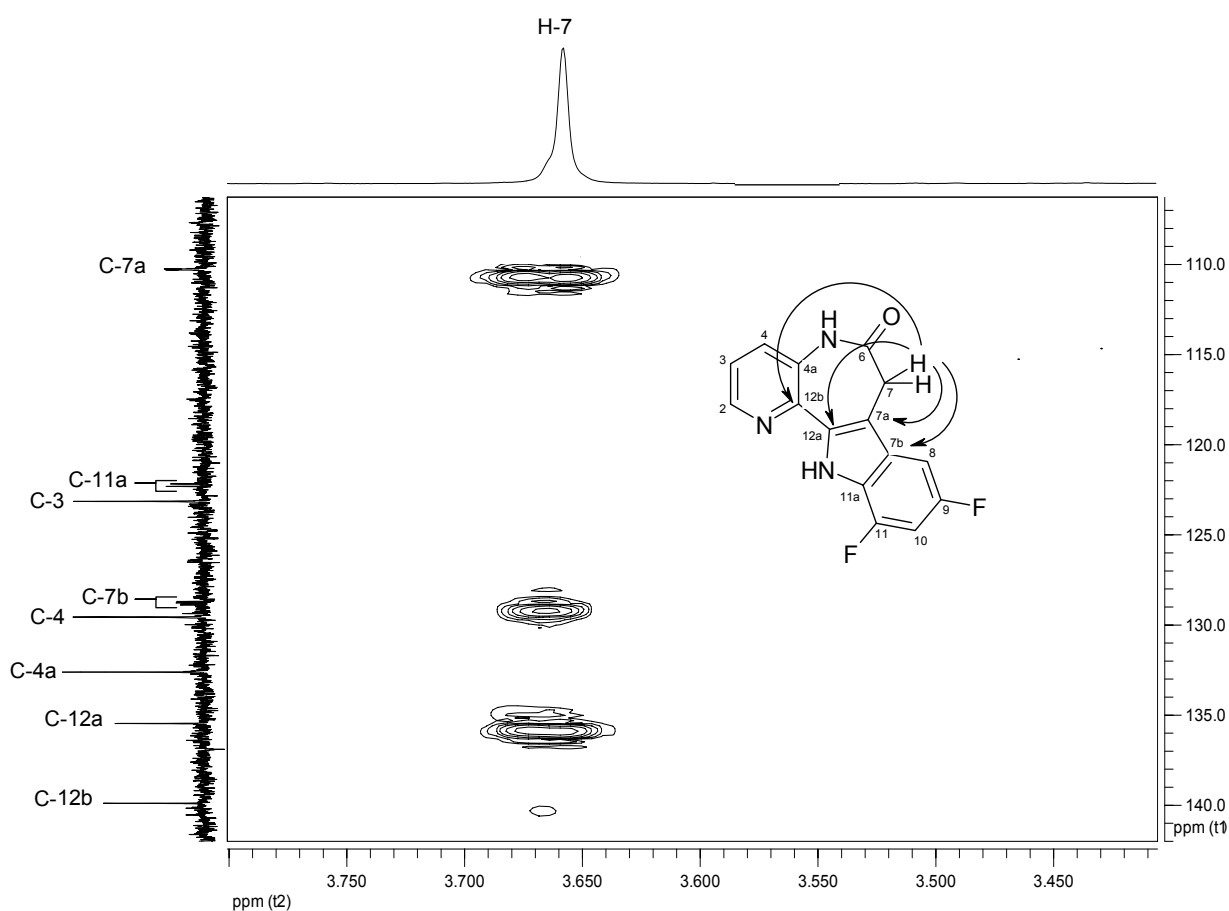
Bei der Auswertung des HMBC-Spektrums wurden zunächst die Kopplungen von den eindeutig zugeordneten Protonen H-2 und H-4 betrachtet. Die zwei intensiven Kreuzpeaks bei ca.  $\delta = 140$  ppm lassen sich den jeweiligen  $^3J$ -Kopplungen zuordnen. Dieses spricht für eine Korrelation beider Protonen mit dem Kern C-12b. Die schwächeren Kreuzpeaks bei ca.  $\delta = 133$  ppm resultieren aus einer  $^4J$ -Kopplung von H-2 und einer  $^2J$ -Kopplung von H-4 mit C-4a. Diese Beobachtung wird gestützt durch den intensiven Kreuzpeak von H-3, der wiederum der  $^3J$ -Kopplung zu C-4a entspricht. Das Kohlenstoffatom C-12a koppelt über 4 Bindungen mit H-4, wobei dies sich eindeutig durch den in Abbildung 5-9 dargestellten Kreuzpeak belegen lässt, der aus einer  $^3J$ -Kopplung mit H-7 resultiert. Aus diesem Ausschnitt kann noch die Korrelation von H-7 mit C-7b belegt werden; wiederum in einer intensiven  $^3J$ -Kopplung. Verwechslungen dieser Kopplung mit der Kopplung zu C-12a können durch die verschiedenen Aufspaltungsmuster der jeweiligen Kohlenstoffkerne ausgeschlossen werden.

Abbildung 5-8: H,C-HMBC-Spektrum für **21**



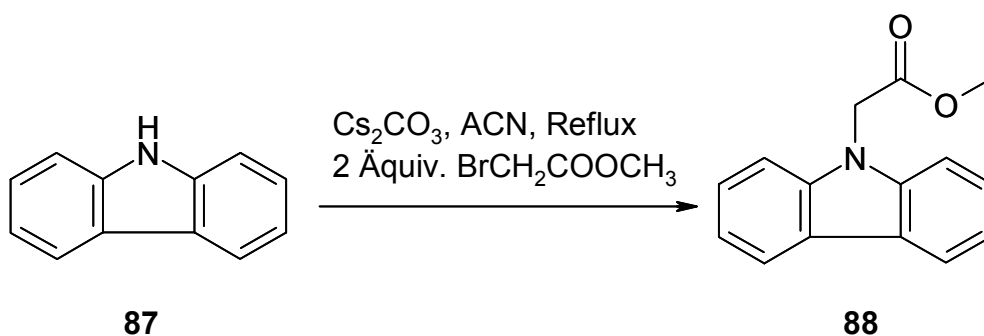
Das verbliebene Kreuzsignal in dieser Abbildung konnte nun eindeutig einer  $^2J$ -Kopplung zwischen H-7 und C-7a zugeordnet werden. Ein erster eindeutiger Beweis für das Vorhandensein eines tertiären C-8, und damit ein Indiz für eine 9,11-Difluor-Substitution, war die  $^3J$ -Kopplung zwischen H-8 und C-7a (Abbildung 5-8). Die intensive  $^3J$ -Kopplung mit C-11a und eine weitere mit C-10 war ein weiterer Beweis für das Vorhandensein eines Protons in Position 8. Zwei intensive Kopplungen von H-10 über drei Bindungen mit C-8 und mit C-11a ergaben den endgültigen Beweis für die Existenz dieses Protons. Auf die weiteren in Abbildung 5-8 dargestellten Signale soll im Detail nicht eingegangen werden. Deren entsprechende Korrelationen belegten ausnahmslos die zuvor vorgenommen Zuordnungen. Abschließend ließen sich alle quartären  $^{13}\text{C}$ -Kerne den entsprechenden Signalen zuordnen. Es wurden keine Korrelationen beobachtet, die auf ein optionales Substitutionsmuster hinwiesen, das von der 9,11-Difluor-Substitution abwich.

Abbildung 5-9: Kopplung von H-7 im H,C-HMBC-Spektrum

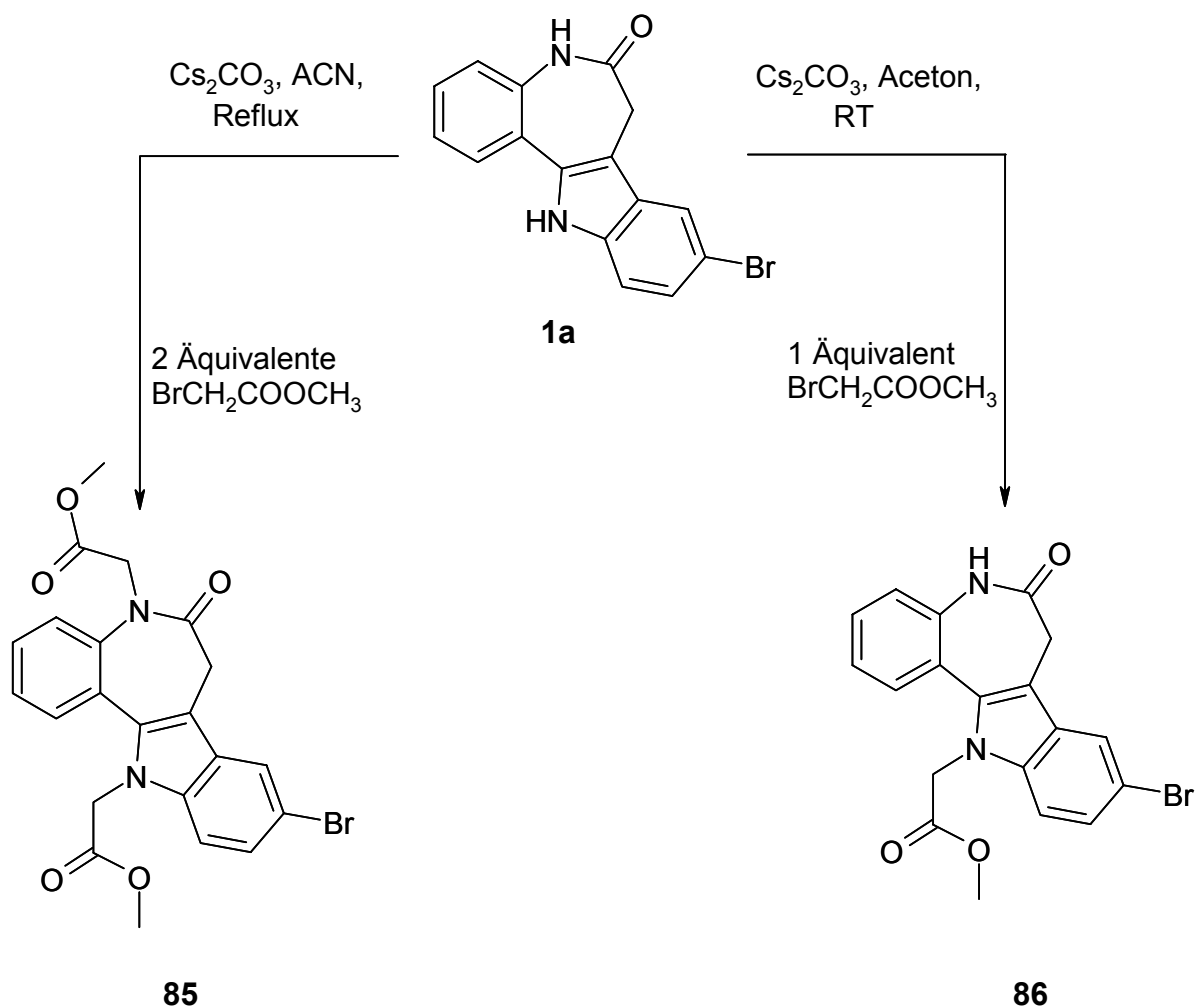


## 5.5 Syntheseversuch von 9,12-disubstituierten 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-onen

Schultz beschreibt die Mono-Substitution am Indol-Stickstoff des Kenpaullons (**1a**) in Aceton in Gegenwart von Kaliumhydroxid. N-Alkylierendes Agens ist dabei Bromessigsäuremethylester in 10-fachem Überschuss.<sup>55</sup> Beim Versuch, diese Synthese zu reproduzieren, kam es unter gleichen Bedingungen neben der Substitution am Indol-Stickstoff zur Zweitsubstitution am Lactam-Stickstoff, so dass **85** erhalten wurde. Reproduziert werden konnte die Monosubstitution am Indol-Stickstoff beim Einsatz des 5-fachen Überschusses an Bromessigsäuremethylester bei ansonsten gleichen Bedingungen (Schema 5-50). Diese zur Darstellung von **86** entwickelten Reaktionsbedingungen erwiesen sich jedoch für eine Übertragung auf 1-Azakenpaullon (**2a**) ungeeignet. Auch nach mehrtägigem Rühren des Ansatzes konnte schließlich nur ein Gemisch aus dem Edukt **2a**, dem dialkylierten Produkt **89** und offensichtlich einem am N-5 monoalkylierten Produkt isoliert werden. In der Literatur wird der Einsatz von Cäsiumcarbonat als Base bei Alkylierungen von Indolen beschrieben.<sup>196</sup> Die relativ gute Löslichkeit von Cäsiumcarbonat in organischen Lösungsmitteln,<sup>197</sup> wie Acetonitril oder *N,N*-Dimethylformamid, und die stärkere Dissoziation von *in situ* entstehenden Cäsium-Salzen im Vergleich zu Lithium-, Natrium- oder Kalium-Salzen werden als Erklärungen für die höheren Ausbeuten und generell besseren Reaktionsbedingungen bei Einsatz von Cäsiumcarbonat herangezogen.<sup>198</sup> Die von Fink vorgeschlagene Methode wurde auf die Alkylierung von Carbazol (**87**) mit Bromessigsäuremethylester übertragen und lieferte den gewünschten 9*H*-Carbazol-9-yl-essigsäuremethylester (**88**) (Schema 5-51).<sup>196</sup> Ein Transfer der Reaktionsbedingungen auf die Alkylierung von 1-Kenpaullon lieferte erneut das disubstituierte Produkt, erst eine Abwandlung der Methode (Aceton als Lösungsmittel, Raumtemperatur, äquimolare Mengen der Edukte) führte zum gewünschten monosubstituierten Derivat **86** (Schema 5-52).



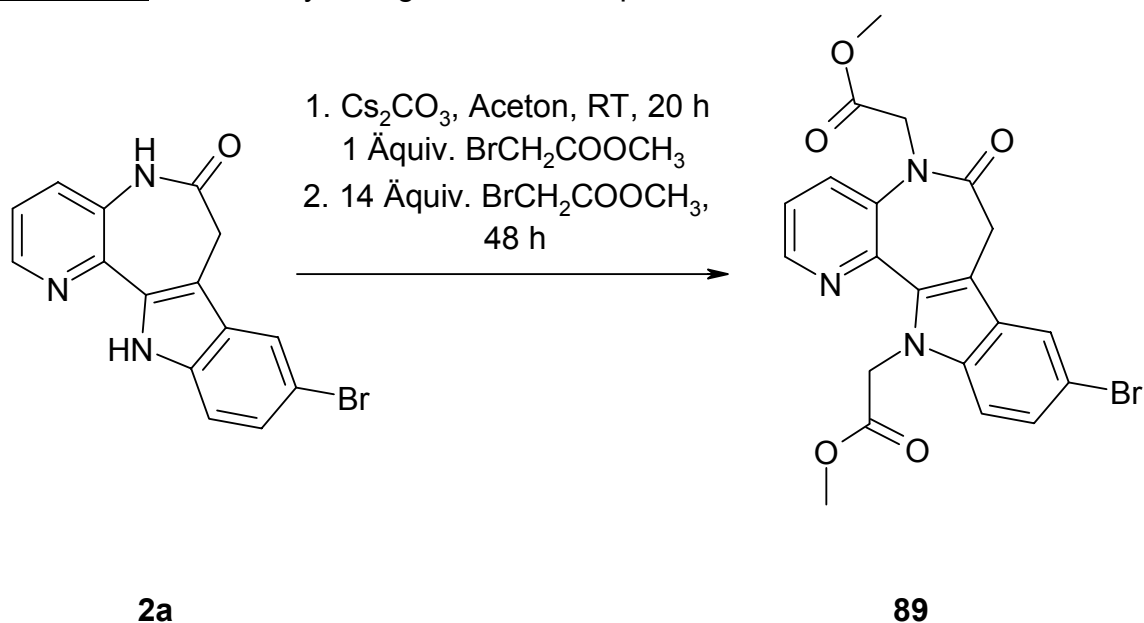
**Schema 5-52:** Alkylierung von Kenpaullon (**1a**) unter Verwendung der Base Cäsiumcarbonat



Diese Reaktionsbedingungen wurden auf die Umsetzung von 1-Azakenpaullon (**2a**) übertragen. Durch die Reaktionskontrolle per DC konnte neben dem Edukt **2a** nach 8 Stunden erstmals ein Produkt detektiert werden. Nach 20 Stunden wurde per DC-Kontrolle neben **2a** und dem sich zunächst gebildeten Produkt eine zusätzliche Verbindung detektiert. Der Vergleich mit den Dünnschichtchromatogrammen der analogen Reaktionen von Kenpaullon (vgl. Schema 5-52) ließ vermuten, dass sich zunächst das monoalkylierte und anschließend das disubstituierte Produkt gebildet hatten. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde die Reaktion schließlich mit 15-fachem Überschuss an Bromessigsäuremethylester weitergeführt, wodurch die Bildung des dialkylierten Produkts forciert wurde, das aus dem Ansatz isoliert wurde (Schema 5-53). Die Auftrennung des Gemisches per Säulenchromatographie wurde

aufgrund der geringen Substanzmengen nicht vorgenommen. Weitere Versuche, ein am Indolstickstoff monoalkyliertes 1-Azapauillon zu gewinnen, blieben erfolglos. Weder die weitere Variation der Reaktionsbedingungen noch die alternative Verwendung von **2b** und **2n** als Edukt lieferte ein in 12-Position monoalkyliertes 1-Azapauillon.

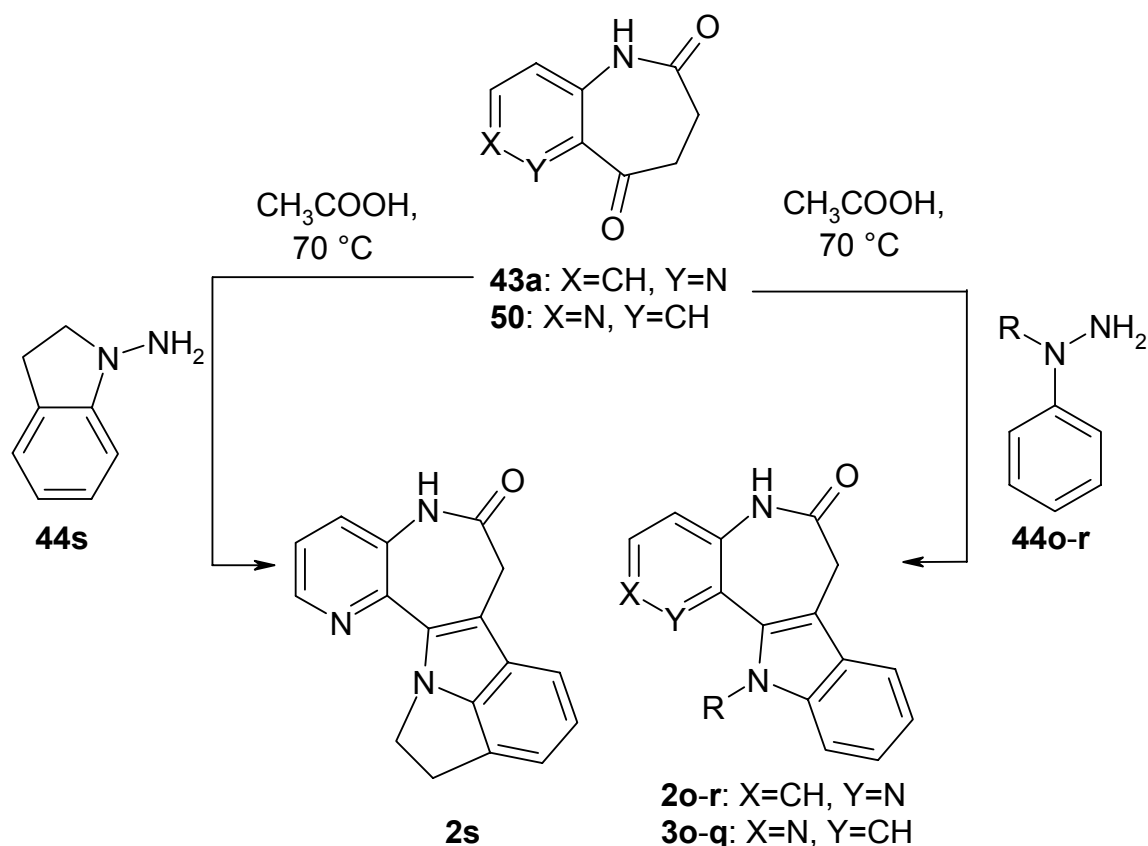
Schema 5-53: Dialkylierung von 1-Azakenpauillon



## 5.6 Synthese von in Position 12 substituierten 1- und 2-Azapauillonon durch Fischer-Indolsynthese mit 1-substituierten 1-Arylhhydrazinen

Da die Position 12 der 1-Azapauillone durch selektive Alkylierung nicht zugänglich war, wurde eine andere Synthesestrategie gewählt. In der Literatur finden sich Beispiele der Fischer-Indolsynthese, die die direkte Umsetzung von Ketonen mit 1-Alkyl-1-Arylhhydrazinen zu N-alkylsubstituierten Indolen beschreiben.<sup>199</sup> Diese Reaktionsführung wurde auch auf 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) und 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**50**) angewendet. Bereits das Erhitzen in Eisessig bei 70 °C führte zu den gewünschten N-12 substituierten 1- bzw. 2-Azapauillonon **2o-s** und **3o-q** (Schema 5-54).

Schema 5-54:      Synthese der N-12 substituierten 1- und 2-Azapapullonen



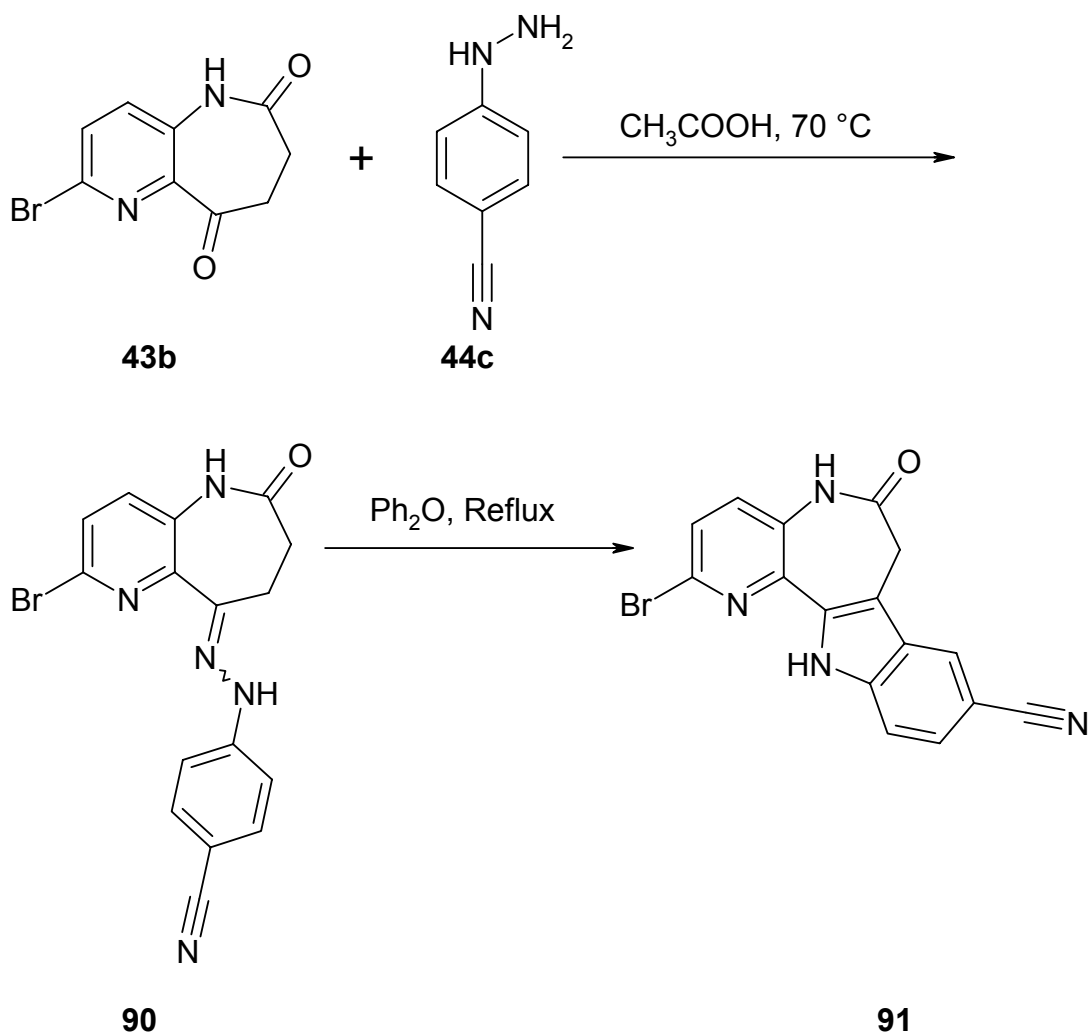
	R=		R =
<b>o</b>	Me	<b>q</b>	Bn
<b>p</b>	Et	<b>r</b>	Ph

## 5.7 Synthesen von in Position 2 und 9 substituierten Paullonen

Um die Effekte einer Substitution in Position 2 zu explorieren, wurden zwei weitere Paullon-Derivate synthetisiert. Dabei sollte eine 9-Cyanosubstitution in den späteren Zielstrukturen berücksichtigt werden, um die in Abschnitt 4.4.2 beschriebene Wasserstoffbrückenbindung zu Lys85 der GSK-3 realisieren zu können. Ausgehend von 2-Brom-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43b**) wurde mit 4-Hydrazinobenzonitril (**44c**) das Hydrazon **90** dargestellt, das sich anschließend in siedendem Diphenylether ringschließen ließ (Schema 5-55). Das erhaltene 2,9-disubstituierte 1-Azapapullon **91** sollte später weiteren Derivatisierungen unterworfen

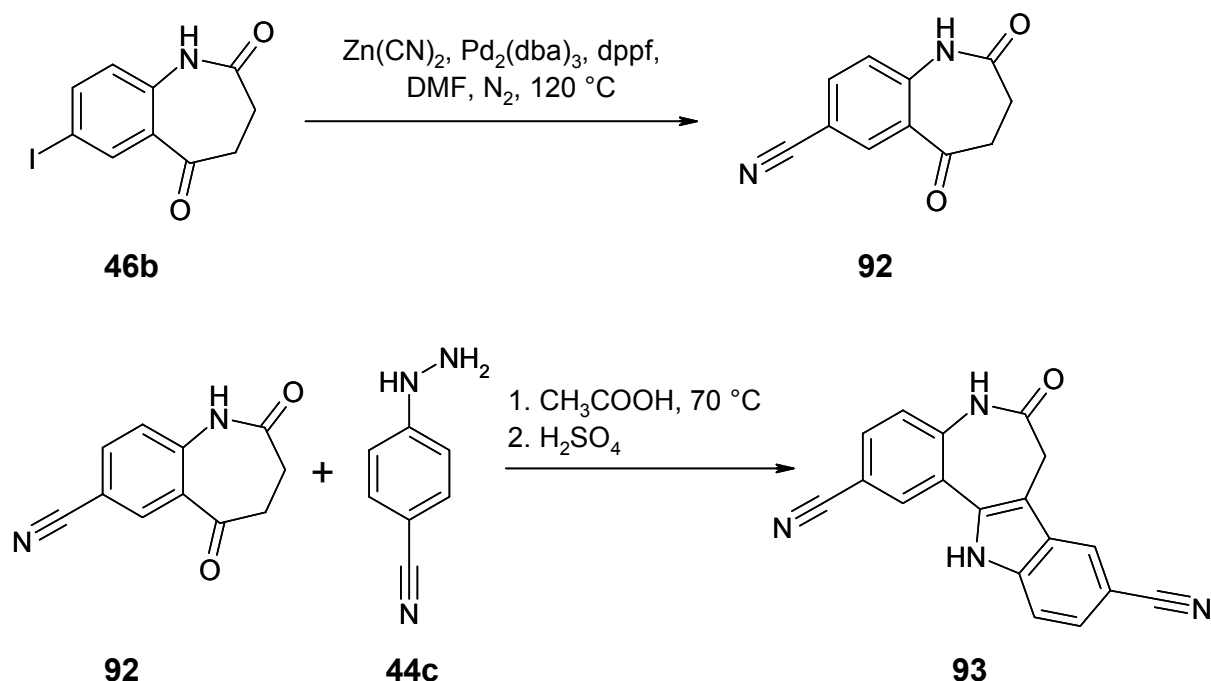
werden. Die in Abschnitt 4.4.5 erwähnte Einführung einer Carbonitril-Funktion in Position 2 des Paullon-Ringsystems wurde ausgehend vom 7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46b**) durchgeführt. Arylhalogenide lassen sich mit Zinkcyanid durch Palladiumkatalyse in die entsprechenden Cyanoarylverbindungen umwandeln.<sup>200</sup> In Gegenwart von Zinkcyanid, Dipalladium(0)-tris(dibenzylidenacetone) ( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ ) und dem Liganden 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen (dppf) konnte **46b** in DMF bei 120 °C unter Stickstoffbegasung zu 2,5-Dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-1-benzazepin-7-carbonitril (**92**) umgesetzt werden. Dieses wurde ebenfalls mit **44c** ohne Isolierung des Hydrazons direkt zum Paullon **93** weiterverarbeitet (Schema 5-56).

Schema 5-55:      Synthese des 2-Brom-5,6,7,12-tetrahydropyrido[3',2':2,3]azepino [4,5-*b*]indol-9-carbonitrils (**91**)





**Schema 5-56:** Synthese des 6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2,9-dicarbonitrils (**93**)



Neben den zuvor beschriebenen Substitutionen des Paullon-Grundgerüsts sollten weitere Derivatisierungen in Position 2 erfolgen. Dabei sollten die in Abschnitt 4.4.5 dargelegten Designüberlegungen einer Alkoxy- bzw. Cyanoalkyl-Substitution berücksichtigt werden. Das Einführen von Alkoxy-Substituenten an Aromaten kann durch eine Palladium-katalysierte O-Arylierung von Arylhalogeniden mittels entsprechender Alkohole in einer Kreuzkupplungsreaktion erfolgen (Schema 5-57). Dabei handelt es sich um eine spezielle Form der Buchwald-Hartwig-Reaktion. Eine Vorschrift, die diese Umsetzung mit verschiedenen Alkoholen und Arylhalogeniden beschreibt, berichtet von Liganden, die in der Lage sind, die Konkurrenzreaktion zu der reduktiven Eliminierung, die  $\beta$ -Hydrideliminierung, zu unterdrücken.<sup>201</sup> In Abhängigkeit von der Substitutionsart des eingesetzten Arylhalogenids (Stellung, Volumen, elektronische Effekte), ist der zu verwendende Ligand entsprechend anzupassen, so dass die Reaktion zu Gunsten der Etherbildung ablaufen kann. Beispielsweise ergeben sterisch weniger gehinderte, *ortho*-substituierte Arylhalogenide höhere Ausbeuten an entsprechendem Ether mit sterisch anspruchsvollen Liganden, während sich *ortho*, *ortho'*-disubstituierte Arylhalogenide

besser in Gegenwart von weniger voluminösen Liganden umsetzen lassen.<sup>202</sup> Einer dieser beschriebenen Liganden (*rac*-2-Di-*tert*-butylphosphino-1,1'-binaphthyl (**94**)) wurde erfolgreich bei der Kupplung von Alkoholen mit 2-Halogenpyridinen eingesetzt.<sup>203</sup> Entsprechend dieser Vorschrift sollten nun 2-Alkoxy-1-azapauillone synthetisiert werden.

Schema 5-57: Palladium-katalysierte Kreuzkupplung zwischen primären Alkoholen und Arylhalogeniden (modifiziert nach Torraca et al.<sup>201</sup>)

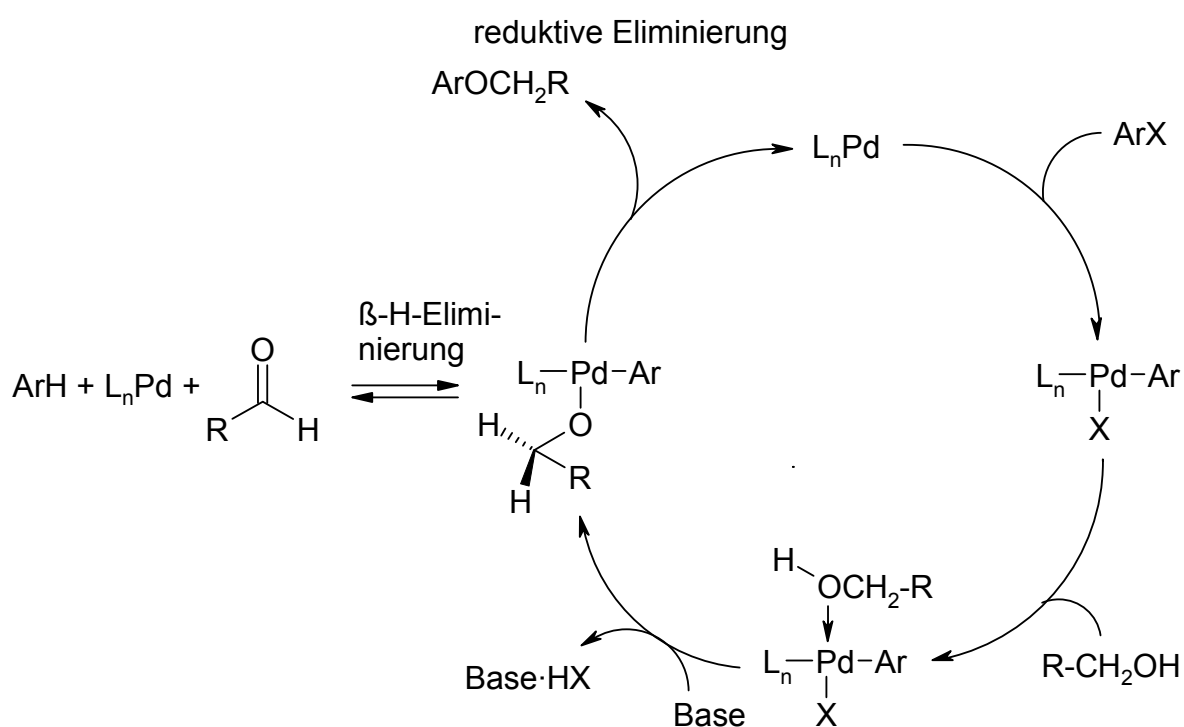
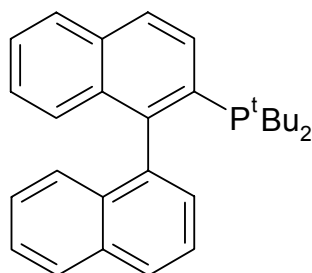
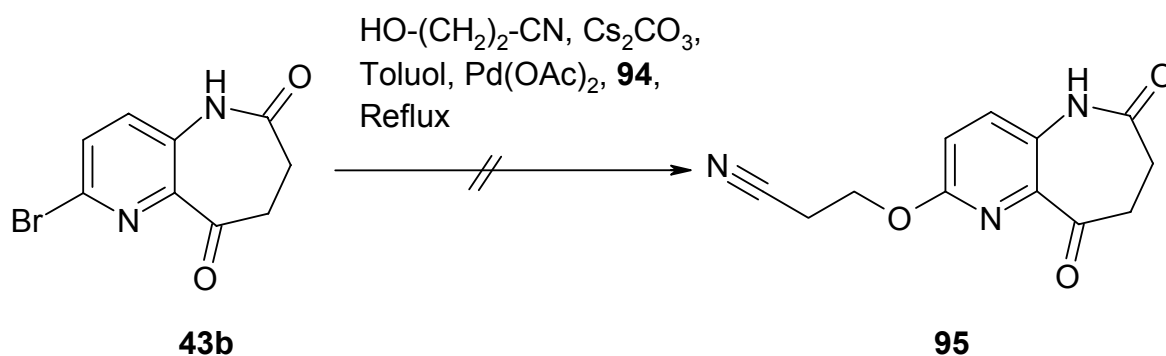


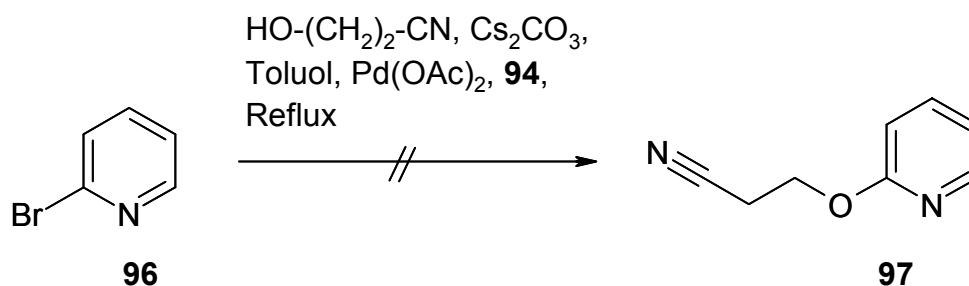
Abbildung 5-10: *rac*-2-Di-*tert*-butylphosphino-1,1'-binaphthyl (**94**)



Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit von **91** in dem vorgesehenen Lösungsmittel Toluol wurde zunächst versucht, **43b** nach der entsprechenden Reaktionsvorschrift umzusetzen.<sup>203</sup> Als Alkohol-Komponente dieser Reaktion sollte 3-Hydroxypropionitril Verwendung finden, um gleichzeitig eine Alkoxy- mit der Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor-Funktion der Nitril-Gruppe in dem entstehenden Produkt zu verbinden. Unter den vorgeschriebenen Bedingungen war keine Umsetzung festzustellen. Die Variation des Lösungsmittels (DMF anstatt Toluol) und des Liganden (dppf anstatt **94**) führt auch nach mehreren Tagen zu keiner Umsetzung. Ebenso blieb der Austausch von **43b** durch ein anderes Edukt (**41b** bzw. **90**) erfolglos. Die direkte Kupplung des 3-Hydroxypropionitrils mit **91** in DMF bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen war ebenfalls nicht möglich. Die Ursache hierfür könnte eine mögliche Wechselwirkung des Palladiums durch die Lactam-Funktion (bzw. Indol-Funktion bei **91**) der Edukte sein. Ähnliches wurde bei dieser Reaktion für Reaktanden mit basischer Amin-, Indol-, Benzimidazol- sowie Pyrazolstruktur beobachtet.<sup>203</sup> Dieser Hypothese lässt sich entgegenhalten, dass Palladium-katalysierte Reaktionen mit dem Analogon **46b** möglich sind (siehe Schema 5-56 und <sup>106</sup>). Da sich das strukturell weniger komplexe 2-Brompyridin (**96**) unter sonst beibehaltenen Bedingungen ebenfalls nicht zum 3-(2-Pyridinyloxy)propionitril (**97**) umsetzen ließ (Schema 5-59), wurde versucht, andere primäre Alkohole zu kuppeln. Doch führte auch die Umsetzung von **43b** weder mit trockenem Ethanol noch mit n-Butanol zu den gewünschten 2-Alkoxyderivaten von **43a**.

Schema 5-58: Versuch zur Synthese von 3-[(6,9-Dioxo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-2-yl)oxy]propionitril (**95**)

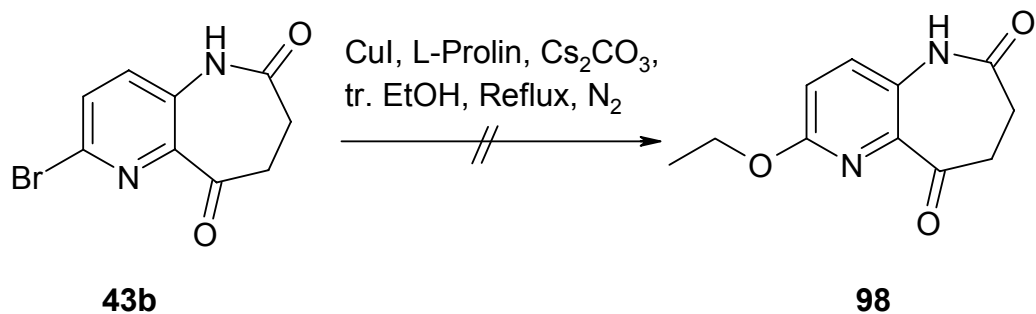


**Schema 5-59:** Versuch zur Synthese von 3-(2-Pyridinyloxy)propionitril (**97**)

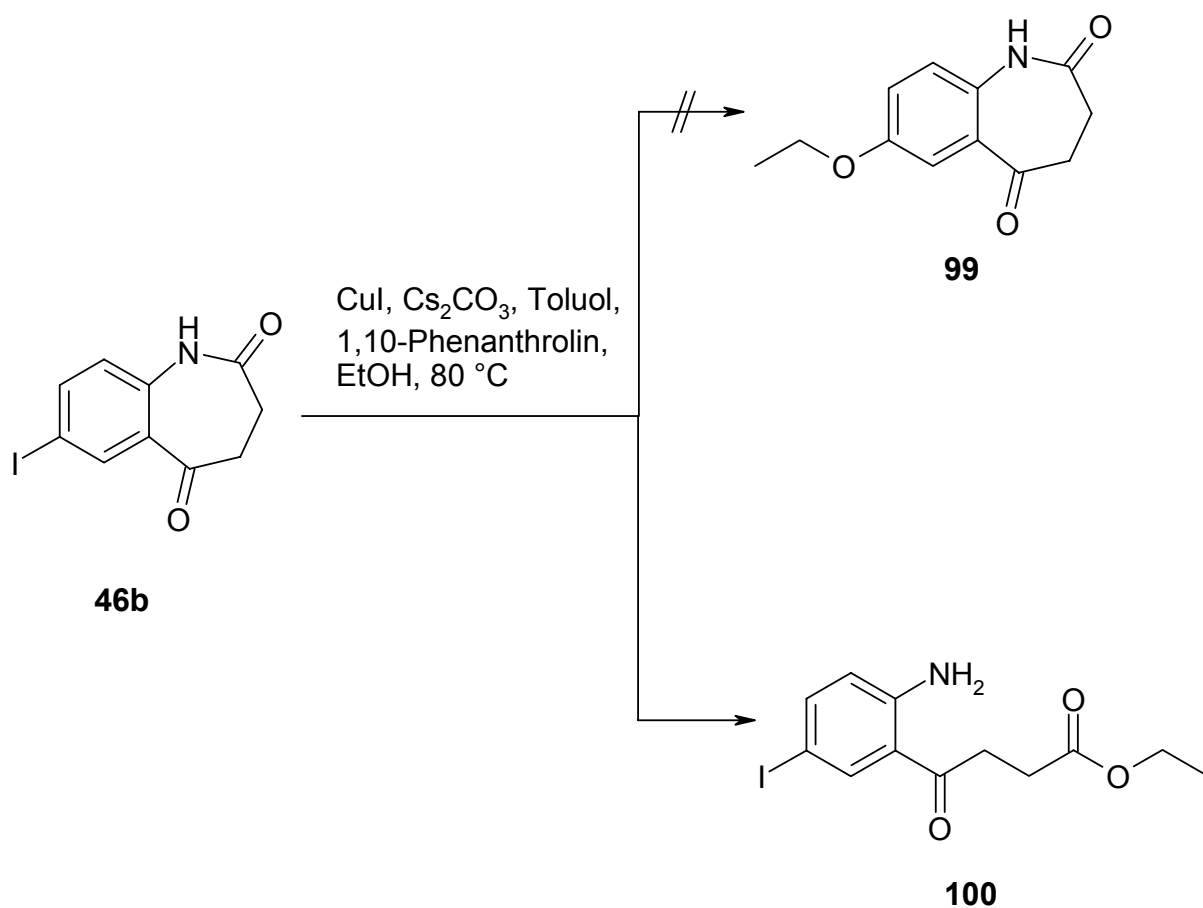
Nach den Versuchen, die Palladium-katalysierte Buchwald-Hartwig-Reaktion mit **43b** durchzuführen, wurde eine alternative Reaktionsführung gewählt. Durch Kupfer(I)-Katalyse in Gegenwart von geeigneten Basen und Additiven wie beispielsweise L-Prolin,<sup>204</sup> lassen sich Ullmann-Reaktionen zwischen Aryliodiden und aliphatischen Alkoholen unter milden Bedingungen bei einer Reaktionszeit von 24 – 40 Stunden durchführen.

Entsprechend der Vorschrift von Zhang und Mitarbeitern<sup>204</sup> wurde versucht, **43b** in trockenem Ethanol unter Zusatz von L-Prolin, Kupfer(I)-iodid und Cäsiumcarbonat zu **98** umzusetzen (Schema 5-60). Bereits nach 30 Minuten wurde im Rahmen der Reaktionskontrolle mittels DC kein Edukt mehr detektiert. Es konnten Spuren eines Produktgemisches isoliert werden, welche nach Beurteilung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums auf eine Ethanolyse des Lactams deuteten. Um diese Reaktion möglichst zu vermeiden, wurde ein aprotisches Lösungsmittel gewählt und der Ethanol in stöchiometrischer Menge zugesetzt. Um der Spaltung des Lactams zusätzlich entgegenzuwirken, wurde zunächst das im Vergleich zu **43b** aus einem elektronenreicheren Aromaten aufgebaute **46b** eingesetzt. Dieses wurde nach Modifizierung der Vorschrift von Wolter und Mitarbeitern<sup>205</sup> mit trockenem Ethanol unter Zusatz von Cäsiumcarbonat, 1,10-Phenanthrolin und Kupfer(I)-iodid in trockenem Toluol bei 80 °C gerührt. Nach 6 Stunden Reaktionszeit war **46b** nicht mehr per DC nachweisbar. Aus dem Ansatz konnte anstatt des gewünschten Kupplungsprodukts **99** der ringoffene  $\gamma$ -Oxobuttersäureethylester **100** nachgewiesen werden (Schema 5-61). Weder mit n-Butanol bzw. 3-Hydroxypropionitril, noch mit Morpholin (in DMSO mit L-Prolin und Kaliumcarbonat anstatt Cäsiumcarbonat),<sup>206,207</sup> konnte ein gekuppeltes Analogon von **43b**, **46b** oder dem 2-Brom-1-azapaullon-Derivat **91** isoliert werden.

Schema 5-60:      Syntheseversuch von 2-Ethoxy-7,8-dihydropyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**98**)



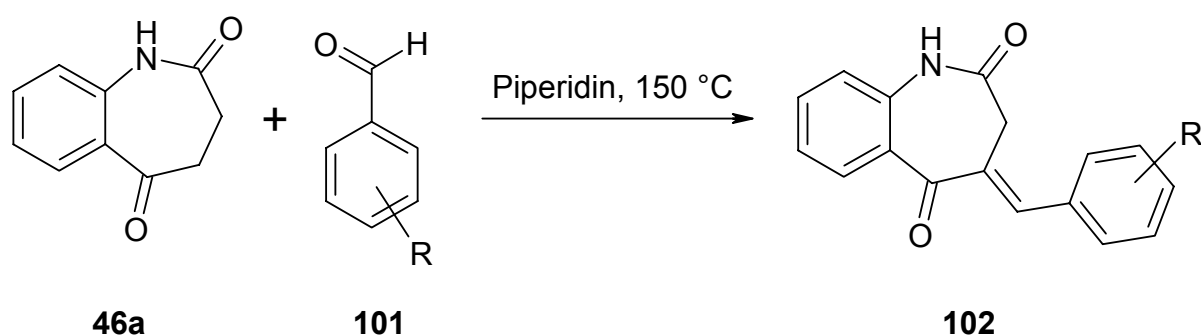
Schema 5-61:      Ringöffnung von **46b**



## 5.8 Synthesen weiterer neuer heterozyklischer Systeme

Ausgehend von 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**) sollten weitere neuartige heterozyklische Systeme synthetisiert werden. Kunick setzte **46a** mit verschiedenen substituierten Benzaldehyd-Derivaten **101** um, was zu den entsprechenden 4-Benzyliden-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionen **102** führte (Schema 5-62).<sup>208</sup>

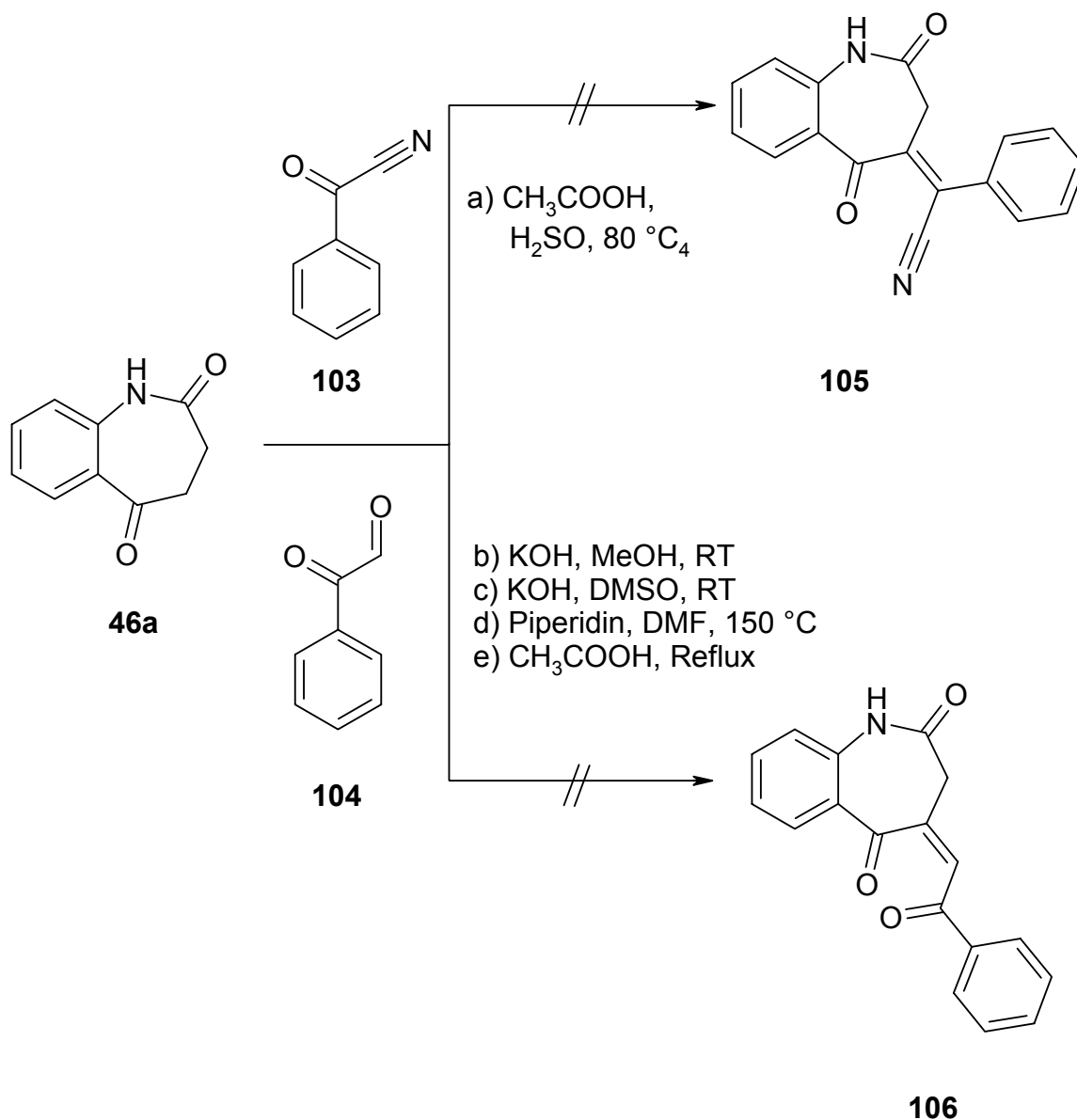
Schema 5-62:



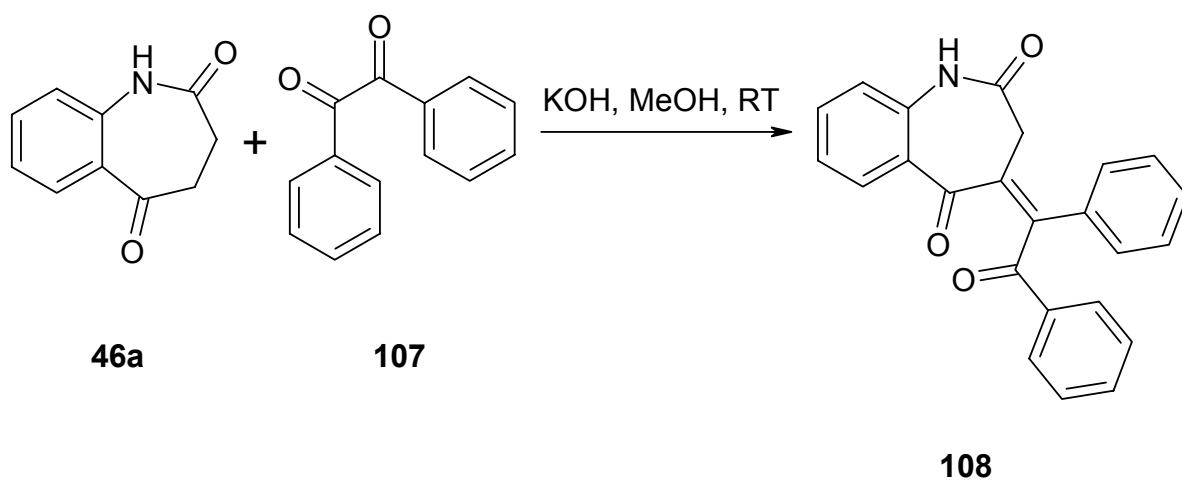
Eine ähnliche Kondensation von **46a** sollte mit verschiedenen Ketonderivaten durchgeführt werden. Dazu wurden Versuche unternommen, Phenylglyoxylsäurenitril **103** (Schema 5-63, Methode a) bzw. Phenylglyoxal **104** (Schema 5-63, Methoden b-e) unter saurer oder basischer Katalyse mit **46a** umzusetzen. Die Reaktionskontrolle mittels DC deutete auf die Entstehung von Produktgemischen hin. Dies war darauf zurückzuführen, dass theoretisch die beiden funktionellen Gruppen der Edukte nucleophil angreifbar sind, was in unterschiedlichen Produkten resultieren kann. Weder **105** noch **106** konnte aus den jeweiligen Reaktionsansätzen isoliert werden. Um die Entstehung eines vielfältigen Produktgemisches von vorne herein zu limitieren, sollte **46a** mit einem symmetrisch aufgebauten Edukt umgesetzt werden. Die Reaktion von **46a** mit Benzil (**107**) in Methanol in Gegenwart von Kaliumhydroxid ergab ein Produkt in 10-prozentiger Ausbeute, dem zunächst die vorläufige Struktur **108** zugeordnet wurde (Schema 5-64). Diese widersprach jedoch den Daten, die mittels der spektroskopischen Methoden ermittelt worden waren. Eine Röntgenkristallstrukturanalyse zeigte, dass das Produkt als Halbketal **110** vorliegt, dessen Entstehung aus der zu **108** tautomeren Struktur **109** erklärbar ist (Schema 5-

65 und Abbildung 5-10). Beim Versuch, diese Reaktionsführung auf **43a** anzuwenden, kam es zur Hydrolyse des Lactams von **43a**, so dass 4-(3-Aminopyridin-2-yl)-4-oxobuttersäure (**112**) anstatt der gewünschten Struktur **111** erhalten wurde (Schema 5-66).

Schema 5-63: Versuche zur Umsetzung von **46a** mit Ketonderivaten



Schema 5-64: Antizipierte Kondensation von Benzil mit **46a**



Schema 5-65: Tautomerisierung und anschließende Halbketalbildung zu **110**

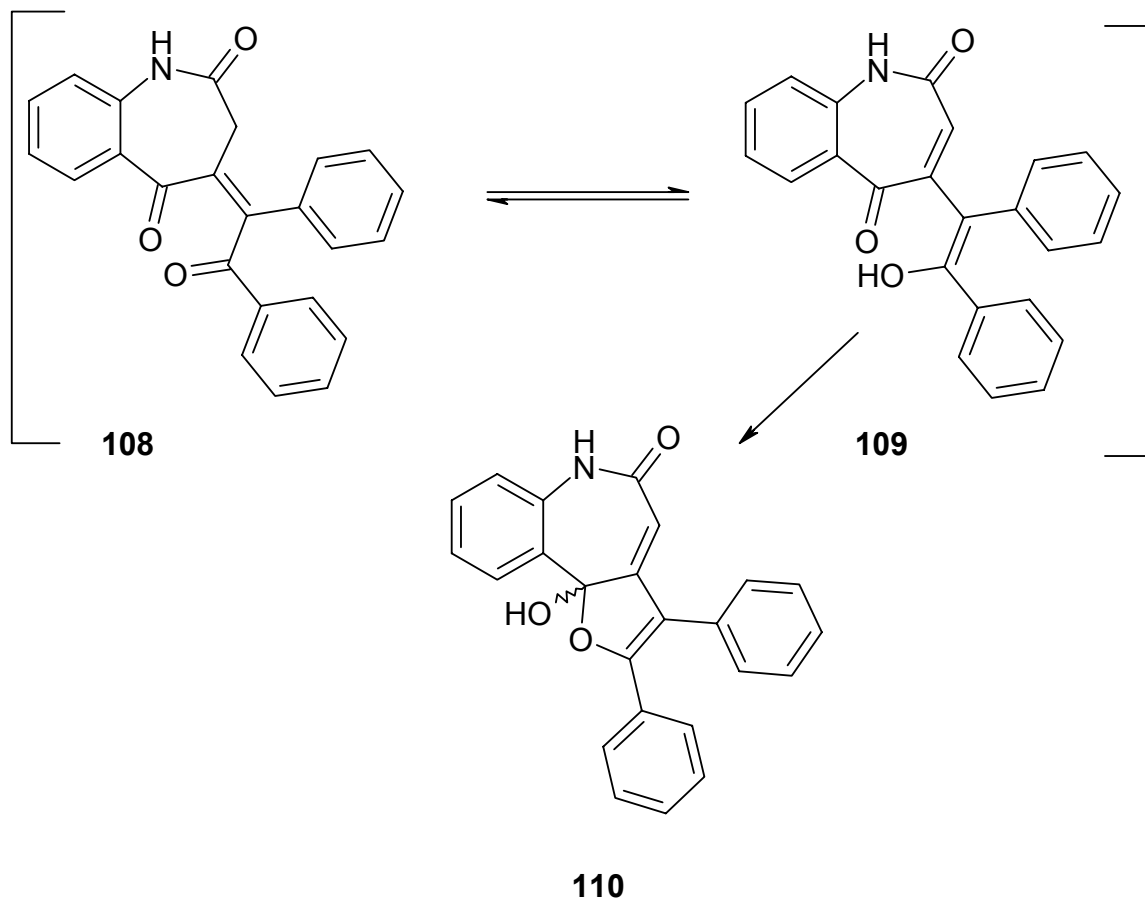
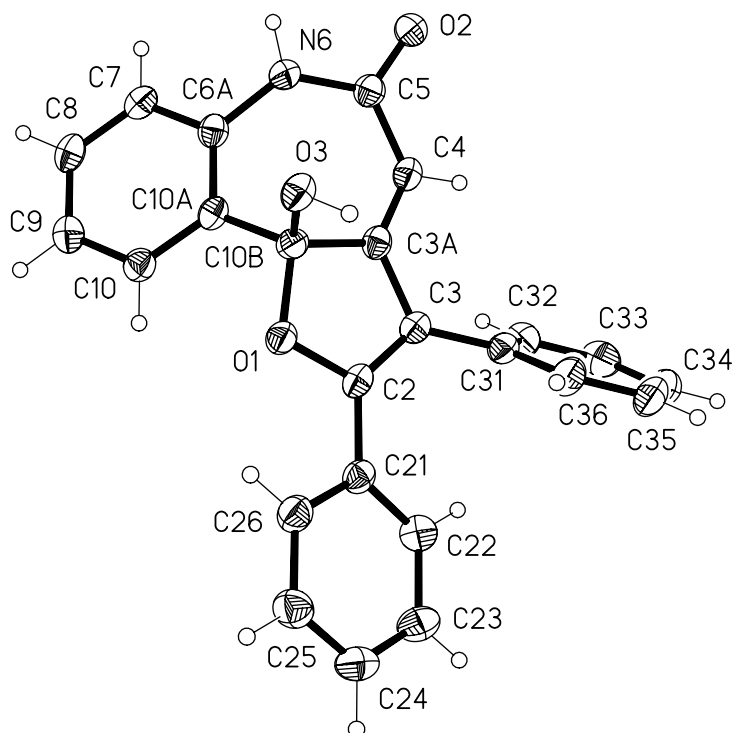
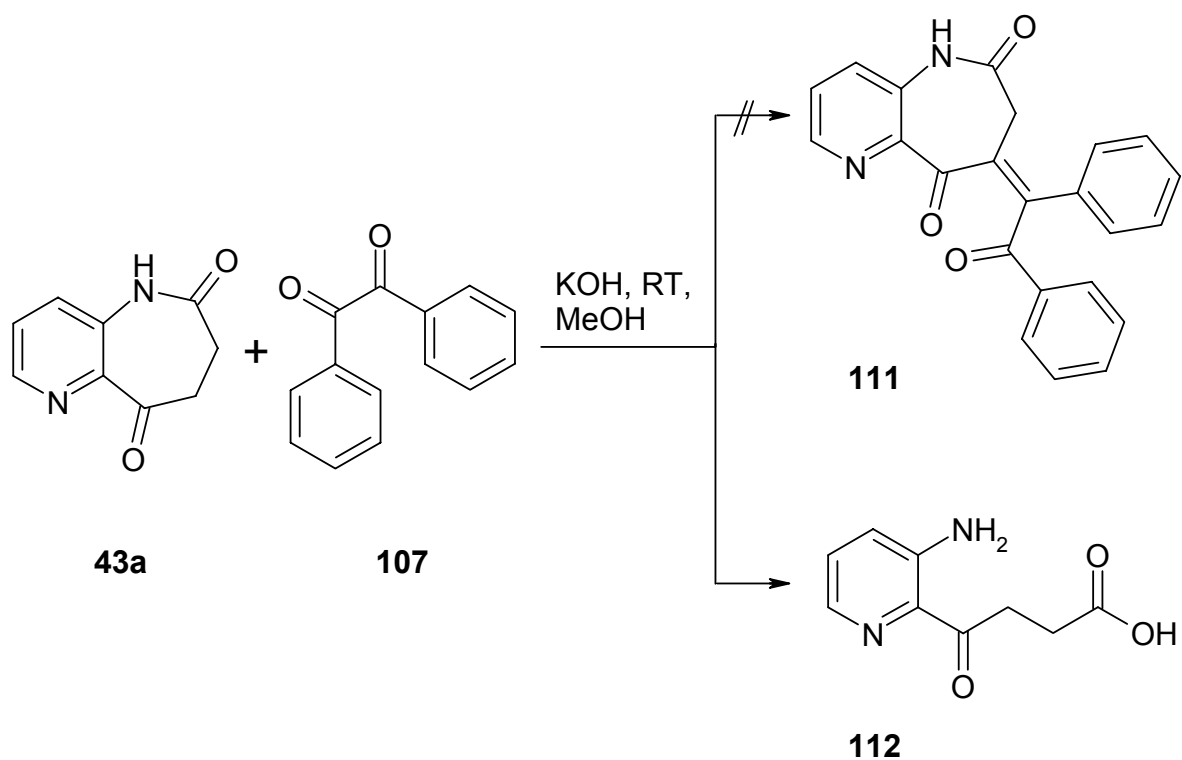




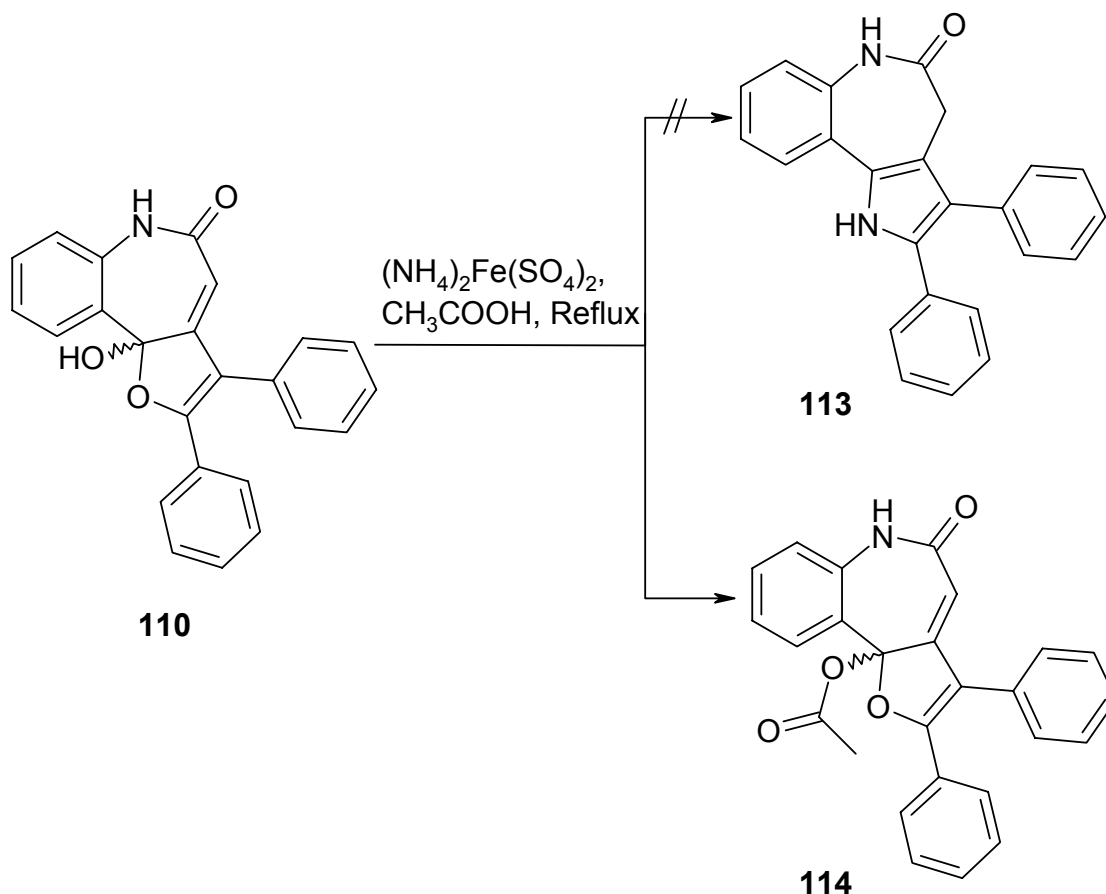
Abbildung 5-10: Röntgenkristallstruktur von **110**<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Abweichung der kristallographischen Nummerierung von der IUPAC-Nomenklatur

Schema 5-66: Hydrolyse des Lactams von **43a**

10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**110**) sollte weiteren Umsetzungen unterworfen werden. Durch Erhitzen in Essigsäure mit Ammoniumeisen(II)-sulfat sollte über Ausbildung eines Imins, dessen nucleophiler Zyklisierung und anschließender Reduktion durch Eisen(II)-Ionen, das Pyrrolo[3,2-*d*][1]benzazepin **113** entstehen. Anstatt dieser Reaktion kam es zur Acetylierung der Hydroxyfunktion an 10b (Schema 5-67).

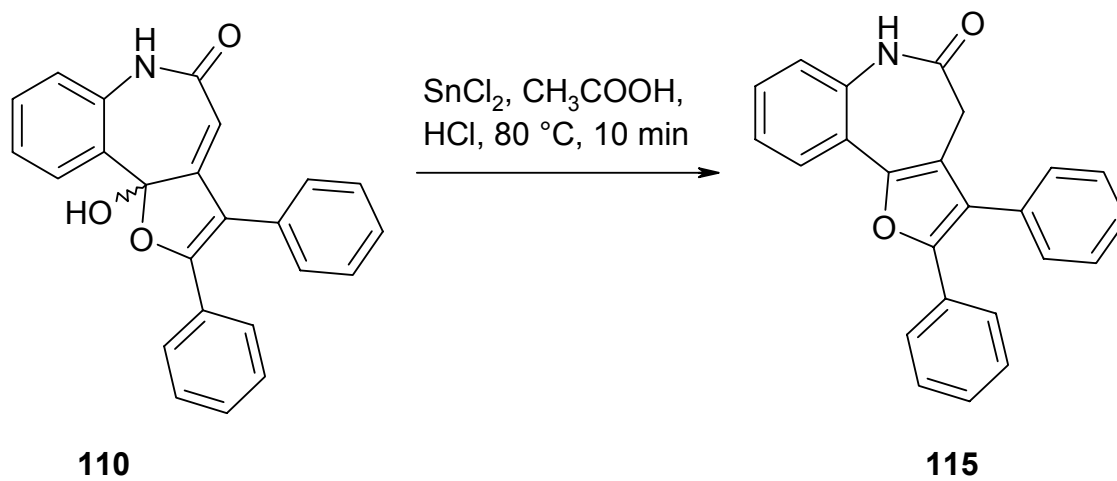
Schema 5-67: Acetylierung von **110** führt zum Ester **114**



Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung bestand darin, **110** zum ungesättigten Furan **115** zu reduzieren. In der Literatur ist eine Methode beschrieben, durch die 1,4-Dioxobut-2-ene in die entsprechenden Furane durch Erhitzen in Salzsäure in Gegenwart des Reduktionsmittels Zinn(II)-chlorid umgewandelt werden.<sup>209</sup> Anwendung dieser Methode auf **110** führte bereits nach 10 Minuten Reaktionszeit zu

2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**115**) in 43-prozentiger Ausbeute (Schema 5-68).

Schema 5-68:      Synthese von 2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**115**)



## 6. Biologische Aktivität und Struktur-Aktivitätsbeziehungen

### 6.1 Proteinkinase-inhibitorische Aktivität

Alle in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Zielverbindungen wurden an den Kinase-Testsystemen für GSK-3, CDK5/p25 und CK1 in den Laboratorien von Laurent Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) getestet. Die inhibitorische Aktivität einiger Azapauillone wurde zusätzlich an CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und Dyrk1a überprüft. Die letztgenannte Kinase Dyrk1a (dual-specificity Yak1-related-kinase) interagiert ähnlich wie GSK-3 mit der Hedgehog-Signalkaskade;<sup>210</sup> zudem ist sie den Cyclin-abhängigen Kinasen in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich.<sup>211</sup> Aus diesem Grund wurde die Aktivität einiger Verbindungen gegenüber dieser Kinase getestet. Ähnliche Gründe lassen sich für die zusätzliche Testung an CDK2/Cyclin A anführen, da CDK1 und CDK2 untereinander die höchste Sequenzhomologie besitzen. CDK2/Cyclin A ist ein wichtiger Regulator im Zellzyklus; er bewirkt den Abschluss der S-Phase<sup>27</sup> und inaktiviert G1-Transkriptionsfaktoren.<sup>20</sup>

Die Vergleiche der Kinase-inhibitorischen Aktivität der einzelnen Verbindungen im folgenden Text beziehen sich auf IC<sub>50</sub>-Werte, welche im Anhang in Tabelle 11-14 (Abschnitt 11.4) dargelegt sind. Der IC<sub>50</sub>-Wert eines Wirkstoffs gibt die Konzentration an, bei der dieser die Aktivität eines Enzyms um die Hälfte der vollen (100-prozentigen) Aktivität reduziert. Der Übersichtlichkeit und visuellen Vergleichbarkeit halber sind in den nachfolgenden Diagrammen anstatt der IC<sub>50</sub>-Werte die pIC<sub>50</sub>-Werte (pIC<sub>50</sub>-Wert = -log<sub>10</sub>(IC<sub>50</sub>-Wert) der einzelnen Verbindungen dargestellt. Bei dieser Darstellungsweise korreliert die Potenz der betrachteten Verbindung mit der Höhe des zugehörigen Balkens.

### 6.1.2 Generelle Anmerkungen zur Interpretation der Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Struktur-Aktivitätsbeziehungen basieren auf der visuellen Inspektion von Dockinglösungen der Moleküle in der ATP-Bindetasche. Die aus den Docking-Experimenten gewonnenen Informationen geben lediglich einen Hinweis auf die Orientierung des Liganden im Raum und dessen mögliche Interaktionen. Die Bindungsaffinität eines Liganden wird von vielen Parametern bestimmt, die durch Docking-Scores nicht ausreichend oder gar nicht beschrieben werden (vgl. Abschnitt 4.4.1.3). Deswegen ist eine Korrelation von Docking-Scores mit tatsächlich gemessenen Werten aus Bindungsassays nur begrenzt aussagekräftig. Die beschriebenen Interaktionen können ein mögliches Indiz für daraus abgeleitete Struktur-Aktivitätsbeziehungen darstellen. Unterschiede in der Bindungsaffinität von Liganden lassen sich nicht allein durch deren Orientierung und deren Interaktionsmöglichkeiten zur Bindetasche beurteilen. Andere Effekte, die insbesondere die Entropiebilanz des Bindungsvorgangs bestimmen, müssen ebenfalls berücksichtigt werden, z. B. der Verlust der Flexibilität des Liganden oder die Freisetzung zunächst gebundener Wassermoleküle (vgl. Abschnitt 4.4.1.3).

### 6.1.3 Inhibitorische Aktivität der in Position 9 substituierten 1-Azapauillone

Bei Betrachtung der  $IC_{50}$ -Werte der in Position 9 substituierten 1-Azapauillone fällt die starke Abhängigkeit der inhibitorischen Aktivität der Verbindung von der Art des Substituenten auf. Insgesamt besitzen Pauillone mit elektronenziehenden Substituenten bessere Kinase-inhibitorische Aktivität als die Derivate mit Elektronendonatoren in Position 9. Sehr gute Ergebnisse weisen die Verbindungen **2c** und **2d** auf. Die Verbindung **2c** zeigt starke Inhibition an GSK-3 ( $IC_{50}$ -Wert = 8 nM) und mäßige Potenz an CDK1/Cyclin B ( $IC_{50}$ -Wert = 0,5  $\mu$ M) und CDK5/p25 ( $IC_{50}$ -Wert = 0,3  $\mu$ M). Unter allen bisher getesteten Pauillonderivaten zeigt **2d** das ausgeprägteste Selektivitätsprofil mit 206-facher Selektivität für GSK-3 gegenüber CDK1/Cyclin B und über 1250-facher Selektivität für GSK-3 gegenüber CDK5/p25.

Die starke Hemmwirkung beider Verbindungen an GSK-3 ( $IC_{50}$ -Wert = 8 nM) korreliert sehr gut mit der vorausgegangen Überlegung, funktionelle Gruppen einzuführen, die mit Lys85 wechselwirken können. Hervorzuheben ist, dass **2c** die einzige Verbindung im Test darstellt, die den Komplex CDK2/Cyclin A im niedrigen submikromolaren Bereich inhibiert.

Eine etwas schwächere inhibitorische Aktivität an GSK-3 zeigen die Derivate mit Halogen-Substituent. Die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen **2f**, **2e** und **2b** an GSK-3 staffeln sich über einen Bereich von 25 bis 80 nM. Alle drei Verbindungen sind selektiv für GSK-3 mit Selektivitäts-Indices von 40, 159, und 56 für GSK-3 gegenüber CDK1/Cyclin B (Selektivitätsindex GSK-3 $\beta$  - CDK1/Cyclin B =  $IC_{50}$ -Wert GSK-3 /  $IC_{50}$ -Wert CDK1/Cyclin B). Ähnliche Relationen ergeben sich für das Verhältnis der inhibitorischen Aktivität zwischen GSK-3 und CDK5/p25. In diesen Bereichen liegen auch die Werte für 1-Azakenpaullon (**2a**), das einen Selektivitätsindex von 111 für GSK-3 $\beta$  gegenüber CDK1/Cyclin B aufweist.<sup>57</sup> Eine nennenswerte Inhibition durch die Halogen-Derivate wird bei der Testung auf CDK2/Cyclin A-Inhibition nicht beobachtet.

Verbindung **2j** ist unter den hier aufgeführten Verbindungen das potenteste 1-Azapaulon mit einem elektronenschiebenden Rest in 9-Position, einer Methylgruppe. Die elektronischen und sterischen Einflüsse dieses Substituenten bewirken ein Absinken der Hemmaktivität im Vergleich zu 1-Azakenpaullon (**2a**), was sich besonders an CDK1/Cyclin B ( $IC_{50}$ -Wert = 8  $\mu$ M) und CDK5/p25 ( $IC_{50}$ -Wert = >10  $\mu$ M) auswirkt. Die Wirkstärke an GSK-3 ( $IC_{50}$ -Wert = 0,13  $\mu$ M) wird hingegen nur leicht abgeschwächt. Die unsubstituierte Verbindung **2g** und das Derivat mit Methoxy-Substituent **2i** zeigen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0,8  $\mu$ M an GSK-3 nur eine schwache inhibitorische Aktivität und keine ausgeprägte Selektivität gegenüber CDK1/Cyclin B bzw. CDK5/p25. Gleiches gilt für **2k**, dessen Aktivität an GSK-3 noch einmal um die Hälfte reduziert ist.

Die schwächste Wirkung an allen Kinasen im Test zeigt das 9-Carboxy-1-azapaulon **2h**. Eine ähnlich niedrige Aktivität wurde auch bei den Kinaseassays des entsprechenden 1-Carba-Analogons von **2h** beobachtet.<sup>212</sup>

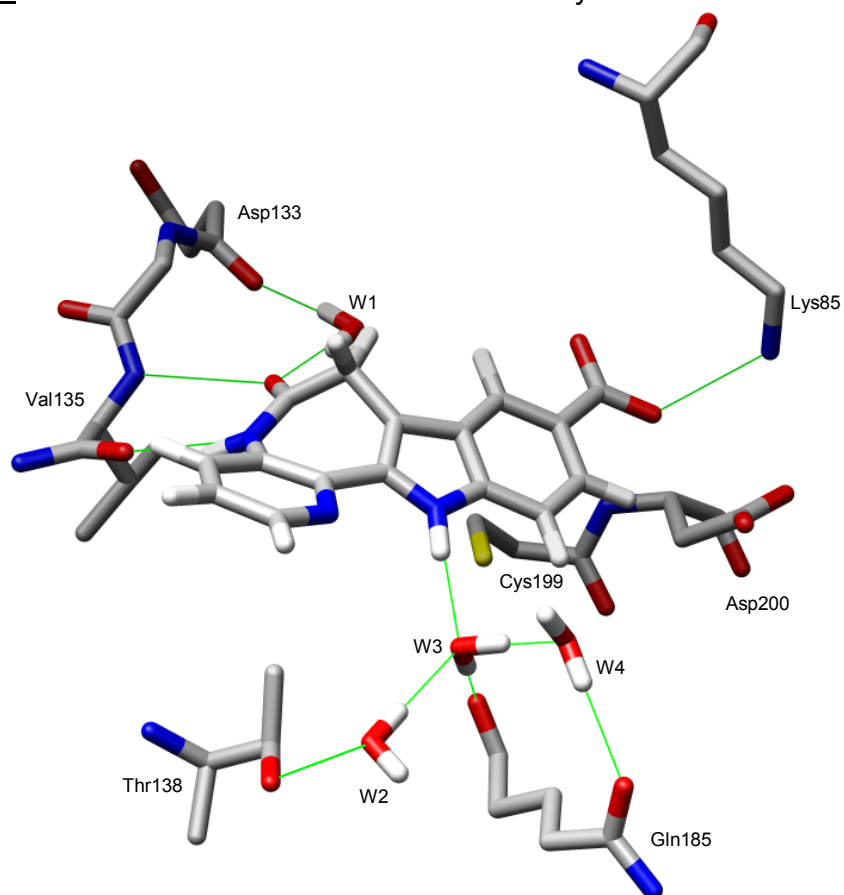
Die Daten von **2h** sind nicht in Übereinstimmung mit den Docking-Ergebnissen, wohl aber mit Aspekten des rationalen Drug-Designs. Dieses Derivat erreicht mit Abstand den höchsten Score während des Dockings, da die Salzbrücke zum Lys85 (Abbildung 6-1) in dem Docking-Algorithmus mit hohen Scores bewertet wird. Durch

Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Paullonen ist bekannt, dass Elektronendonatoren in Position 9 die Wirkung, z. B. an CDK1/Cyclin B,<sup>148</sup> stark abschwächen. Da die Aktivität der Verbindungen in den Kinase-Assays bei einem pH von 7,2 (CDK1/Cyclin B)<sup>213</sup> bzw. 7,5 (GSK-3)<sup>214</sup> bestimmt wird, ist davon auszugehen, dass die Carbonsäure in **2h** deprotoniert vorliegt. Dies erzeugt die Möglichkeit der Ausbildung einer Salzbrücke zu Lys85, führt jedoch parallel zu einer negativen Ladung. Die starke Elektronendonator-Wirkung des Carboxylat-Anions schwächt die Aktivität der Verbindung **2h** drastisch ab, da der Bindungsenergiegewinn aus der Salzbrücke den für die Bindung negativen Einfluss des Elektronenüberschusses nicht kompensieren kann. Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Solvatisierung der Carboxylat-Funktion. Es besteht die Möglichkeit, dass die zur Abstreifung der Solvathülle nötige Energie nicht aufgebracht wird, selbst wenn diese Energie durch die Ausbildung einer Salzbrücke zu Lys85, welches ebenfalls desolvatisiert vorliegen müsste, überkompensiert würde. Diese Aspekte könnten die schlechte Affinität von **2h** in den ATP-Bindetaschen erklären.

Eine Begründung für die Selektivität der 1-Azapaulone für GSK-3 lässt sich durch die Betrachtung der Hinge-Region der verschiedenen Kinasen herleiten. Die Hinge-Region der CDK1 weist ein Aspartat (Asp86)<sup>32</sup> an der Position auf, in der sich in der GSK-3β Thr138 befindet. Die negative Ladung der Carboxyl-Funktion in der Aspartatseitenkette könnte zu einer elektrostatischen Abstoßung des partiell negativ geladenen Pyridin-Stickstoffs in Position 1 der 1-Azapaulone beitragen, was zu einem Affinitätsverlust an CDK1 führt.

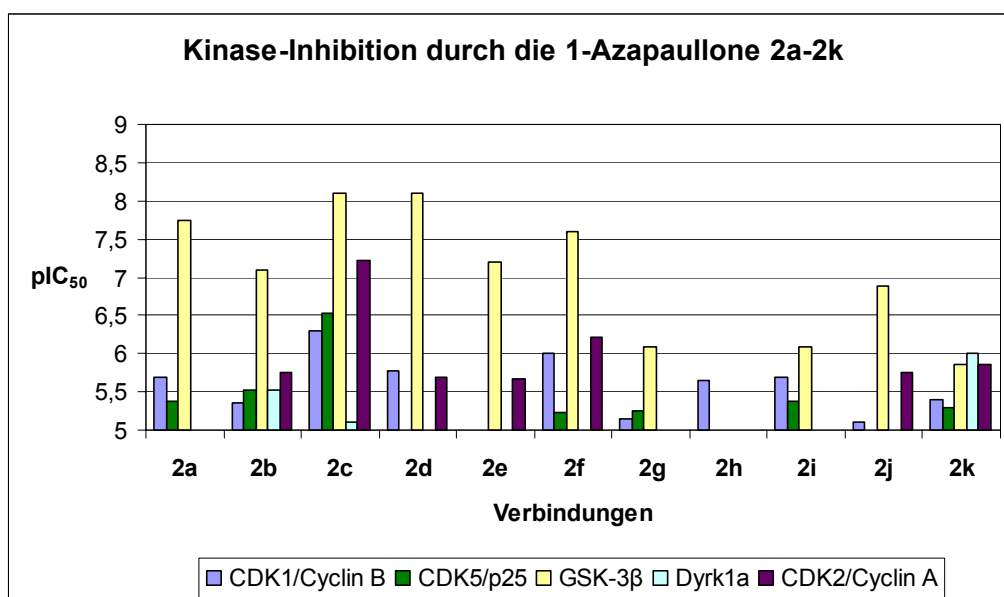
Da sich die ATP-Bindetasche der CDK5 nur durch drei Aminosäuren und geringfügig in der Ausdehnung von der CDK1 unterscheidet (siehe Abschnitt 1.1.2), lassen sich für die Selektivität für GSK-3 gegenüber CDK5 ähnliche Kriterien anführen.

Abbildung 6-1: Salzbrücke zwischen dem Carboxylat-Anion von **2h** und Lys85



(grüne Linien indizieren Wasserstoffbrückenbindungen, gedockt mit FlexX<sup>140</sup>, graphisch bearbeitet mit Chimera<sup>120</sup>) (strukturelle Basis des Proteins: PDB: 1Q3W)

Abbildung 6-2<sup>a</sup>:





### 6.1.4 Inhibitorische Aktivität der in Position 9 substituierten 2-Azapauillone

Bei Analyse der Ergebnisse aus den Kinase-Assays der 2-Azapauillone ergibt sich eine ähnliche Korrelation zwischen der Art des Substituenten und der ermittelten Aktivität, wie sie auch schon bei den 1-Azapauillonen beobachtet wurde. Insgesamt besitzen die 2-Azapauillone eine schlechtere Selektivität für GSK-3, allerdings bei einer den 1-Azapauillonen vergleichbar starken Wirkung. Die an GSK-3 potensten Vertreter dieser Klasse sind das Trifluormethyl-Analogon **3d** ( $IC_{50}$ -Wert = 13 nM), die 9-Chlor-Verbindung **3e** ( $IC_{50}$ -Wert = 18 nM) und das Carbonitril-Derivat **3c** ( $IC_{50}$ -Wert = 21 nM). Auffällig ist die Aktivität der Verbindung **3c** an CDK1/Cyclin B ( $IC_{50}$ -Wert = 31 nM) und an CDK5/p25 ( $IC_{50}$ -Wert = 32 nM), so dass keine Selektivität mehr gegenüber GSK-3 erreicht wird. Eine geringere GSK-3-Selektivität des 2-Aza- im Vergleich zum 1-Azapauillon lässt sich auch für das Verbindungspaar **2d/3d** feststellen.

Eine starke Inhibition an GSK-3 erfolgt auch durch die Fluor- und Brom-Derivate **3a** und **b** mit  $IC_{50}$ -Werten von 51 nM bzw. 52 nM, wobei die Selektivität wiederum schwächer ausgeprägt ist als bei den 1-Aza-Analoga. Das 9-Methoxy-2-azapauillon **3i** zeigte eine zweifach stärkere Hemmung der GSK-3 als das entsprechende Derivat der 1-Azaserie **2i**.

Als Begründung der durchgängig beobachteten geringeren Selektivität der 2-Azapauillone im Vergleich zu den 1-Azapauillonen lässt sich erneut Asp86 der CDK1 anführen. Dadurch, dass in den 2-Azaderivaten der Pyridin-Stickstoff nicht mehr direkt auf die Carboxyl-Funktion des Asp86 gerichtet ist, sondern in Position 2 vorliegt, verringert sich der repulsive Effekt. Die Folge ist ein besseres Fitting in der CDK1-Bindetasche. Weitere Hinweise für eine stärkere Affinität der 2-Azapauillone liefern die Konturdiagramme von CDK1/Cyclin B<sup>43</sup> und CDK5/p25,<sup>215</sup> die mittels CoMSIA erstellt wurden. Diese indizieren, dass ein negativ elektrostatisches Potenzial im Bereich um Position 2 des Pauillongrundgerüsts zur Affinität beitragen könnte, was durch die elektronischen Eigenschaften der 2-Azapauillone gegeben ist. CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) ist ein Verfahren, bei dem die physikochemischen und sterischen Eigenschaften von Molekülen im Raum mit ihren Bindungsaffinitäten korreliert werden. Verschiedene Moleküle werden überlagert und in einem Gitter positioniert. An den Schnittstellen des Gitters wird die

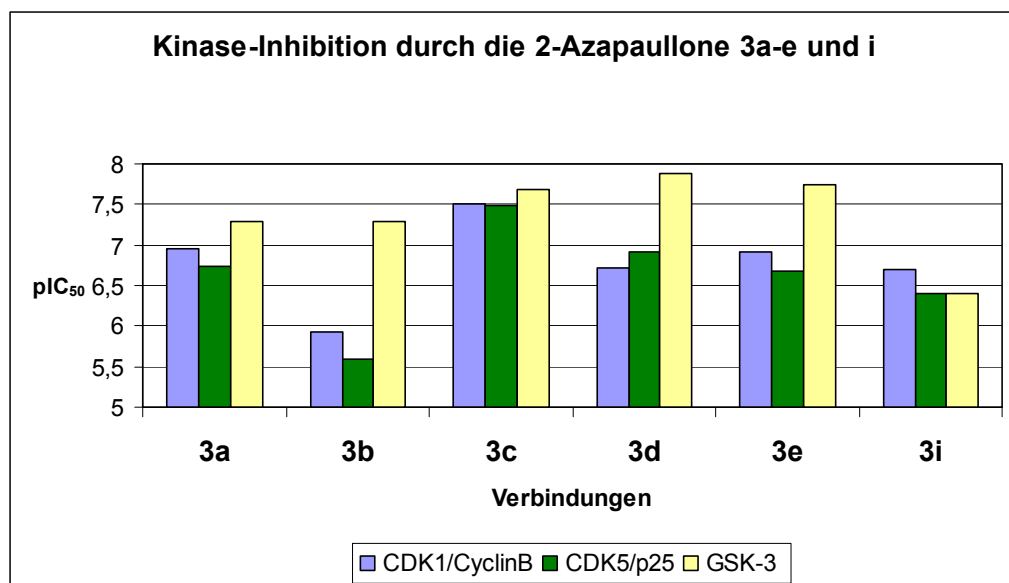
relative Ähnlichkeit des am Gitterpunkt positionierten Atoms zu einer Sonde bestimmt. Als Sonden dienen Atome mit ihren spezifischen Eigenschaften. Die Sonden können variiert werden und tasten das gesamte Gitter ab. Das Ähnlichkeitsmaß ist abstandsabhängig und wird durch eine Gauß-Funktion ermittelt. Durch die Aufteilung des Ähnlichkeitsmaßes in einzelne räumliche und physikochemische Eigenschaften kann genau bestimmt werden, an welcher Position im Molekül welche Eigenschaft Einfluss auf die biologische Aktivität ausübt. Die daraus erhaltenen Konturdiagramme kennzeichnen Bereiche, in denen bestimmte funktionelle Gruppen eines Moleküls die biologische Aktivität positiv oder negativ beeinflussen.<sup>138</sup>

### 6.1.5 Inhibitorische Aktivität der 12-Oxapaulлоне

Die drei synthetisierten 12-Oxapaulлоне zeigten keine inhibitorische Wirkung in den Kinase-Assays. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen dem in Position 9 unsubstituierten Derivat **4g** und den Halogen-substituierten Vertretern **4a** und **4e** festgestellt werden. Die während des Designs vorgenommene Überlegung, dass ein Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor in Form eines Sauerstoffatoms in Position 12 zu einem Paullonderivat mit Affinität zur ATP-Bindetasche führt, wurde somit widerlegt. Dieses gilt offensichtlich auch für das Einführen anderer Atome in dieser Position. Kürzlich publizierte Ergebnisse bestätigen diese Beobachtung: Ein 12-Thia-Analogon von **4g**, welches unter gleichen Bedingungen in den Kinase-Assays der mit uns kooperierenden Gruppe von L. Meijer getestet wurde, zeigte ebenfalls keine inhibierende Wirkung an GSK-3, CDK1/Cyclin B und CDK5/p25.<sup>216</sup>

Im Hinblick auf die weitere Optimierung dieser Substanzklasse sind die erhaltenen Ergebnisse ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Paullonderivate insgesamt.

Abbildung 6-3:



### 6.1.6 Inhibitorische Aktivität der N-substituierten Azapauillone

Im Gegensatz zu der stärkeren Affinität der in Position 9 substituierten 1-Azapauillone verglichen mit entsprechenden 2-Azapauillonen, stellen sich die Ergebnisse bei den N-substituierten Derivaten anders dar. Insgesamt zeigen alle Verbindungen Präferenz für GSK-3 im Vergleich zu CDK1/Cyclin B und CDK5/p25. Eine Erklärung dafür lässt sich ebenfalls aus den erwähnten Konturdiagrammen der Pauillone ableiten. Demnach wirkt sich eine Substitution an N-12 unvorteilhaft auf die Positionierung der Pauillone in CDK1 und CDK5 aus. Die GSK-3 $\beta$  hingegen toleriert eine Substitution am Indolstickstoff, wie ebenfalls aus den Konturdiagrammen ersichtlich ist.<sup>43</sup> Ein Hinweis für die bessere Potenz der 2-Azapauillone im Vergleich zu den 1-Azapauillonen könnte sich ebenfalls aus den elektrostatischen Verhältnissen der ATP-Bindetasche ableiten. Bei Betrachtung der Dockinglösungen des Derivats **3q** wird die Exposition des negativ elektrostatischen Potenzials des Pyridin-Stickstoffs in Richtung des elektrostatisch komplementären Bereichs um Arg141 der GSK-3 $\beta$  offensichtlich (Abbildung 6-4, schwarze Ellipse). Durch die Lage des Pyridin-Stickstoffs in Position 1 bei **2q**, ist dieser elektrostatische Bereich nicht mehr auf den Bereich um Arg141 ausgerichtet und teilweise durch den Benzylrest abgeschirmt (Abbildung 6-5, schwarze Ellipse). Die besseren Interaktionsmöglichkeiten der N-substituierten 2-Azapauillone in dem

angesprochenen Bereich könnten zur Affinität an GSK-3 beitragen. Betrachtet man die Substituenten untereinander, so lässt sich keine Präferenz für sterisch anspruchsvolle oder weniger anspruchsvolle Reste in N-12 feststellen. Während bei der weniger voluminösen Methyl- und Ethyl-Substitution bei den 2-Azapauillonon  $IC_{50}$ -Werte von 0,40  $\mu$ M und 0,80  $\mu$ M an GSK-3 beobachtet werden, resultiert die Benzyl-Substitution in einem  $IC_{50}$ -Wert von 0,38  $\mu$ M. Die Werte der entsprechenden 1-Azaderivate **2o-q** zeigen 2,5-, 16,3- und 5,5fach schwächere Hemmaktivität an GSK-3. Das Phenyl-substituierte 1-Azapauillonon **2r** zeigt neben dem Ethyl-substituierten Derivat **2p** das schlechteste Inhibitionsprofil.

Interessant ist die Bindungsaffinität des pentazyklischen Ringsystems **2s**. Es zeigt von allen N-substituierten 1-Azaderivaten die beste Hemmwirkung an GSK-3 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0,41  $\mu$ M. Eine Begründung dafür lässt sich aus der relativ ebenen Struktur der Verbindung ableiten. Abbildung 6-4 zeigt, dass sich das planare Molekül räumlich sehr gut in die ATP-Bindetasche einfügt und diese sehr gut ausfüllt. Dieses Fitting in der GSK-3 ist auch von anderen Inhibitoren mit planarer Molekülstruktur (Indirubin-3'-monoxim, Staurosporin) bekannt.<sup>56</sup>

Abbildung 6-3: Das pentazyklische Ringsystem von **2s** in der ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$ <sup>a</sup>

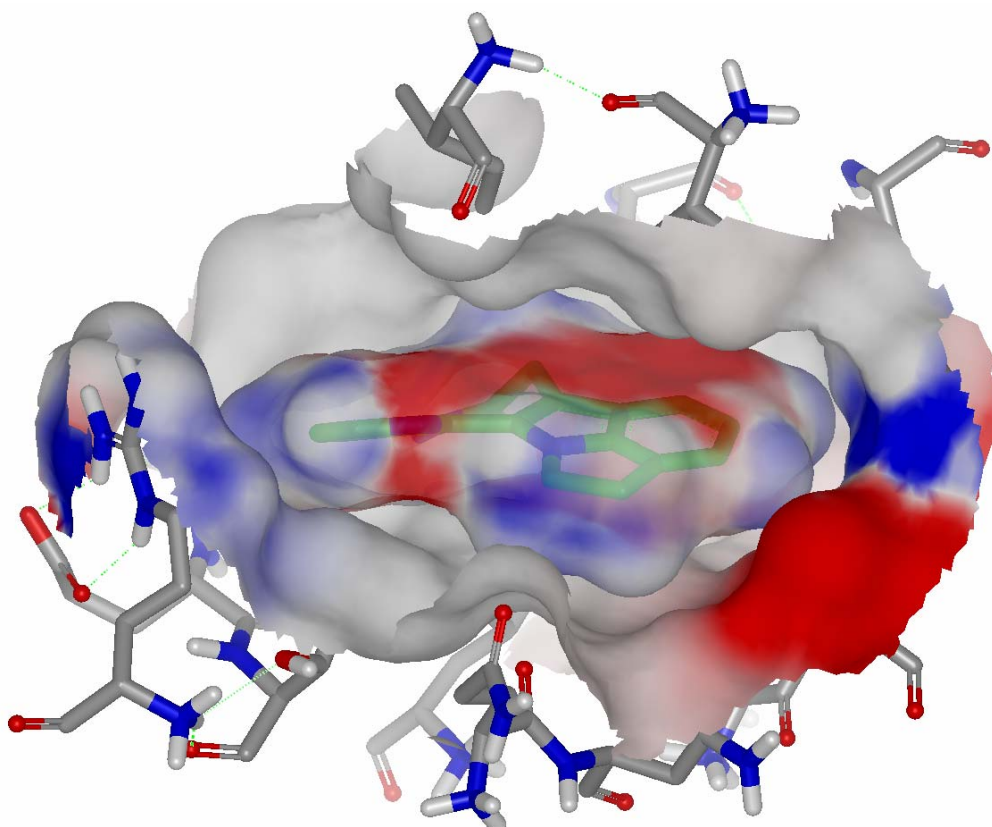


Abbildung 6-4: Docking-Lösung von **3q** in der Bindetasche der GSK-3 $\beta$ <sup>a</sup>

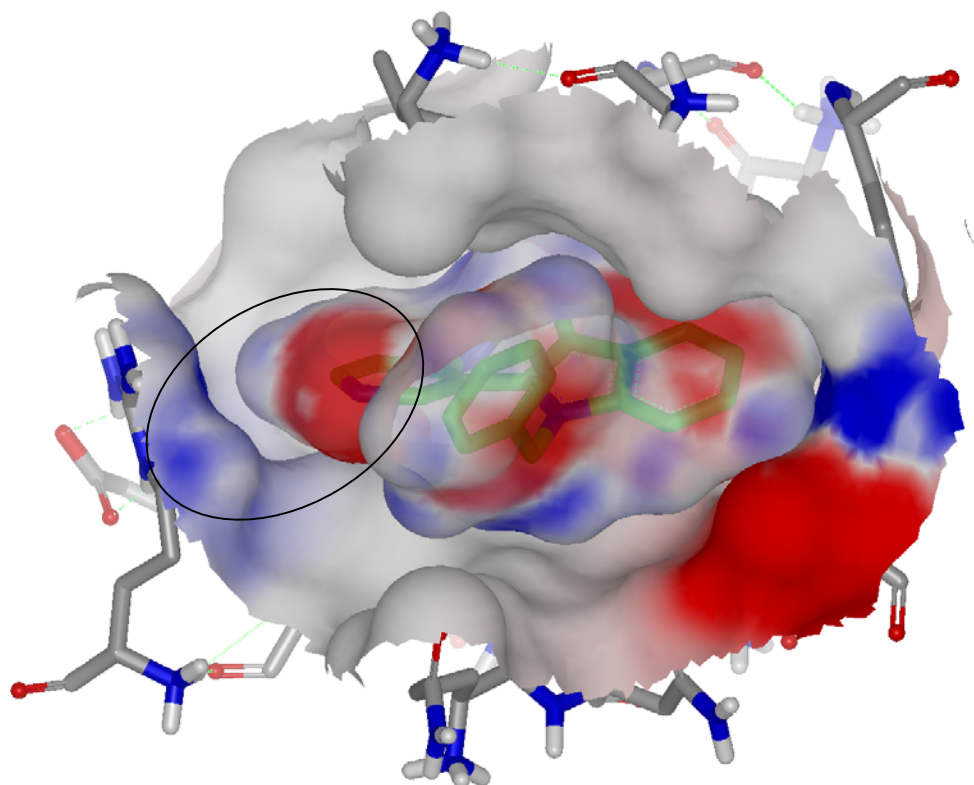
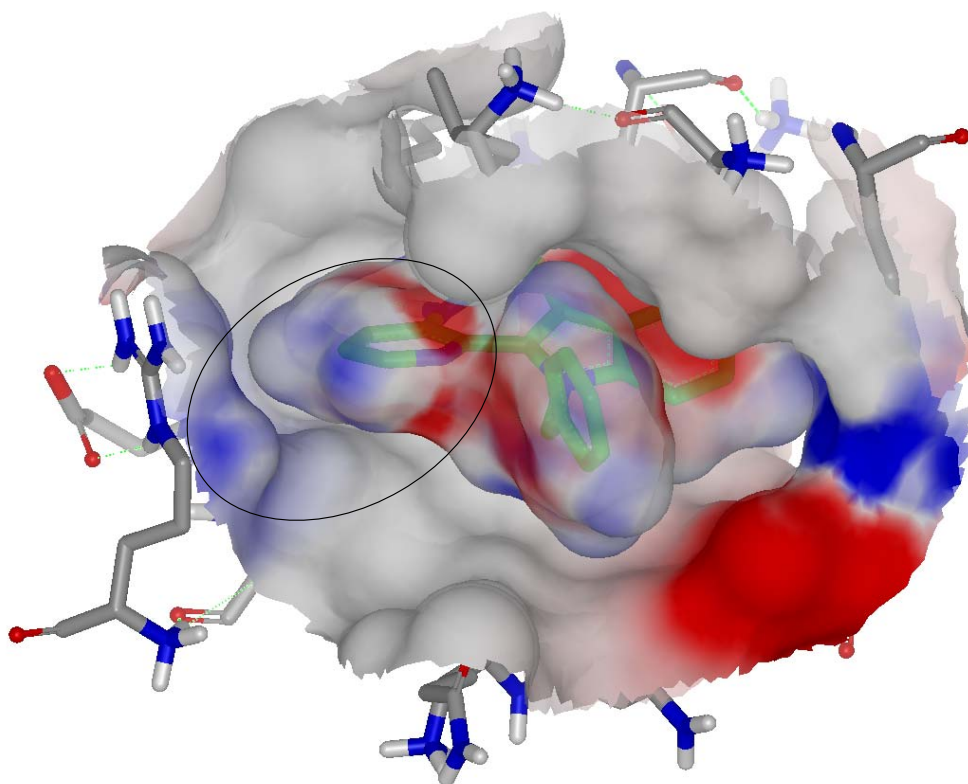


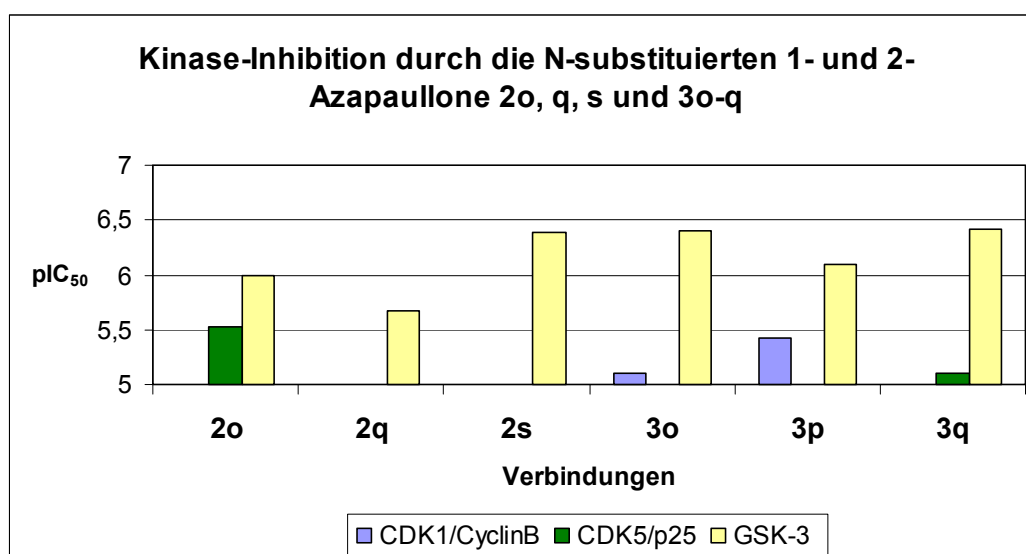
Abbildung 6-5: Docking-Lösung von **2q** in der Bindetasche der GSK-3 $\beta$ <sup>a</sup>



<sup>a</sup>Aufbereitung der Liganden siehe Experimenteller Teil, visualisiert mit Vida<sup>217</sup>, elektrostatische Oberflächenbelegung: rote Bereiche indizieren negative Bereiche, blaue positive Bereiche

Das zweifach alkylierte Derivat des 1-Azakenpaullons **89** zeigt eine sehr schwache Inhibition in allen drei Kinaseassays. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der niedrigen inhibitorischen Aktivität von Paullonen, die an Position 5 substituiert sind. Durch die Substitution an N-5 kann das Derivat keine Interaktionen zum Val135 der Hinge-Region in der GSK-3 $\beta$  eingehen (vgl. Abschnitt 4.3), was ebenfalls dazu führte, dass mit FlexX keine sinnvolle Orientierung dieses Moleküls in der Bindetasche berechnet werden konnte.

Abbildung 6-6<sup>a</sup>:



<sup>a</sup>Fehlende Balken weisen auf einen pIC<sub>50</sub> von < 5 (bzw. IC<sub>50</sub> > 10  $\mu$ M) hin.

### 6.1.7 Inhibitorische Aktivität der 2,11- und 9,11-disubstituierten Paullone

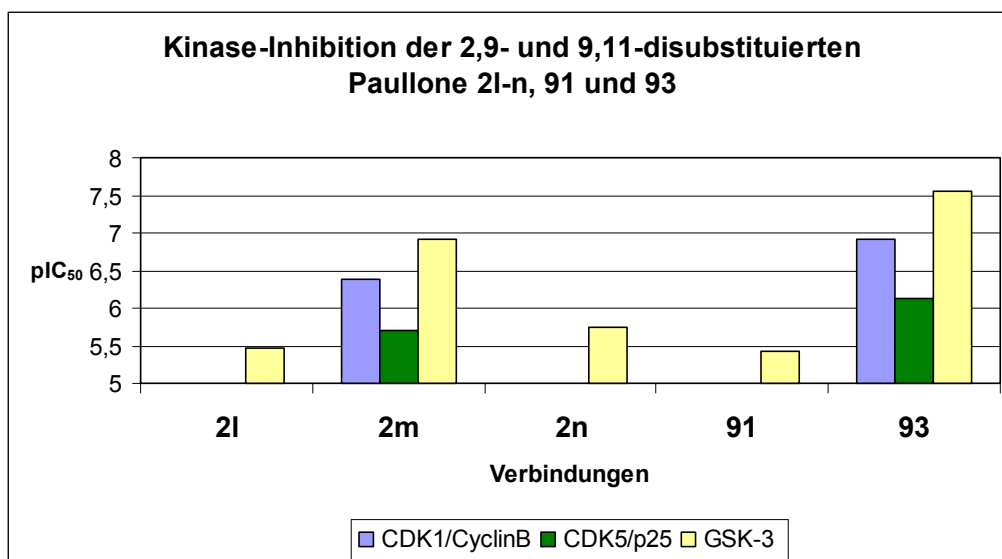
Die unterschiedlichen Substitutionsmuster der Derivate **2l-n** sowie **91** und **93** gab weiteren Aufschluss über Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Paullonderivaten in der ATP-Kavität. Ein großvolumiger Substituent in Position 2, wie Brom in **91**, wird offensichtlich weder von der GSK-3 noch von den CDK toleriert. Hingegen fügt sich die Carbonitril-Funktion in der gleichen Position offensichtlich besser in die Gegebenheiten der ATP-Bindetaschen der betrachteten Kinasen ein (vgl. Abschnitt 4.4.5 und Abbildung 4-13). Das Paullon-2,9-dicarbonitril **93** zeigt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 28 nM starke Inhibition an GSK-3. Eine gewisse Selektivität ist gegenüber den

CDK vorhanden, was sich in  $IC_{50}$ -Werten von 0,12  $\mu$ M und 0,73  $\mu$ M an CDK1/Cyclin B und CDK5/p25 ausdrückt.

Die Halogen-Substitution an Position 11 der Derivate **2l** und **m** wirkt sich im Vergleich zu den unsubstituierten Analoga negativ aus. Der 11-Fluor-Substituent in **2l** bewirkt eine über 22-fache Senkung der Affinität an GSK-3 im Vergleich zu **2b**. Durch die 11-Iod-Substitution wird die Aktivität von **2m** bei Vergleich mit **2c** um das 15fache gesenkt (vgl. Abschnitt 4.4.2). Das in Abschnitt 4.4.2 erwähnte schlechte Fitting des 8,10-Dichlor-substituierten Derivats **2n** bestätigt sich in den Kinaseassays, was sich in  $IC_{50}$ -Werten von über 30  $\mu$ M an CDK1/Cyclin B, 100  $\mu$ M an CDK5/p25 und 3,4  $\mu$ M an GSK-3 ausdrückt.

### 6.1.8 Inhibitorische Aktivität der Furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-one

Im Gegensatz zu den Verbindungsklassen **2** und **3** waren die neuartigen Strukturen **110** und **115** nicht das Ergebnis eines rationalen Drug Design-Prozesses, sondern wurden als Resultat einer synthetisch präparativ ausgerichteten Studie erhalten. Trotzdem wurde die Kinase-inhibitorische Aktivität beider Verbindungen in den beschriebenen Assays überprüft. Es stellte sich heraus, dass die Substanzen keine nennenswerte Hemmaktivität an CDK1/Cyclin B, CDK5/p25 und GSK-3 aufweisen.

Abbildung 6-7<sup>a</sup>:

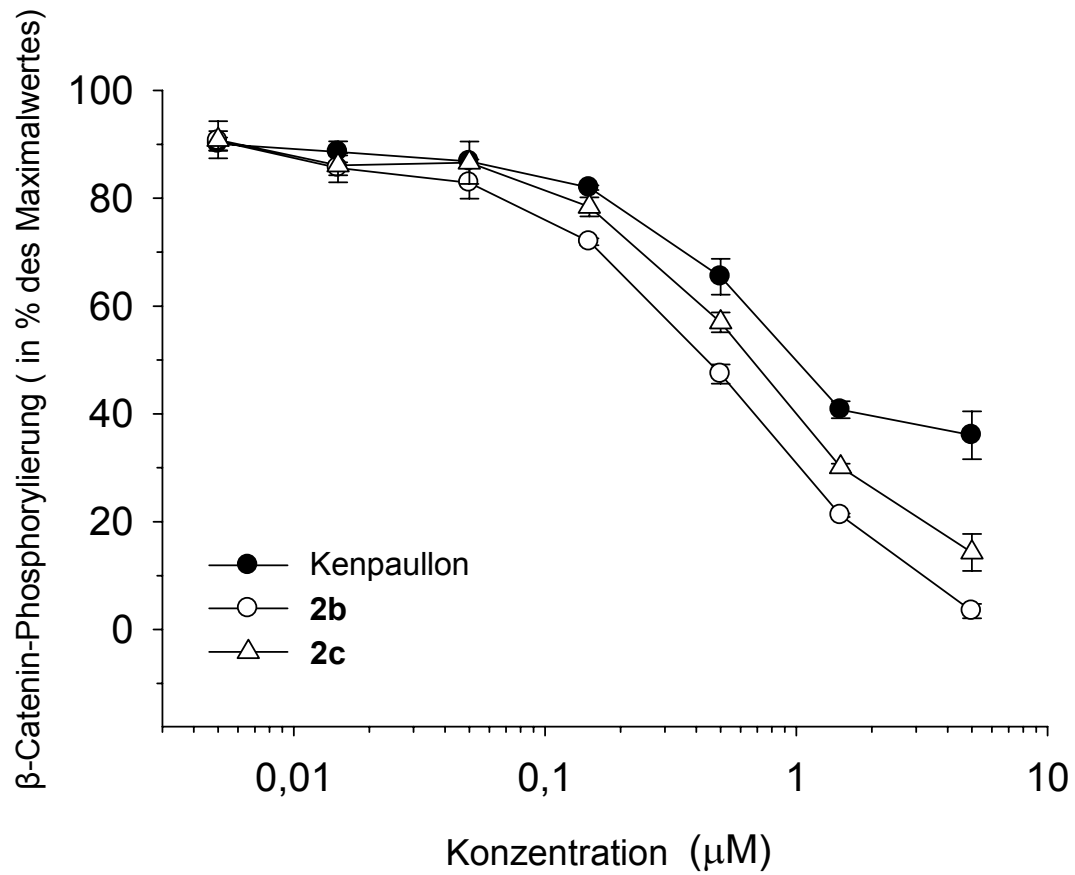
<sup>a</sup>Fehlende Balken weisen auf einen pIC<sub>50</sub> von < 5 (bzw. IC<sub>50</sub> > 10 µM) hin.

## 6.2 Untersuchung zur intrazellulären GSK-3-inhibitorischen Aktivität

Neben den vorangegangenen Aktivitätstests in den Kinase-Assays wurde in der Arbeitsgruppe von L. Meijer (CNRS Station Biologique, Roscoff, Frankreich) zusätzlich die inhibitorische Aktivität in einem Zell-basierten Modell überprüft, indem die  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung beobachtet wurde. Dazu wurden SH-SY5H Neuroblastomazellen Kenpaullon (**1a**), **2b** und **c** in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Um einen zu schnellen Abbau des phosphorylierten  $\beta$ -Catenins zu verhindern, wurden konstante Konzentrationen des Proteasom-Inhibitors MG132 zugesetzt. Das Ausmaß der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung durch die GSK-3 konnte durch einen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bewertet werden. Wie aus Abbildung 6-5 zu entnehmen ist, kommt es unter Einfluss der Paullonderivate zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der GSK-3, was sich durch ein Absinken der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung ausdrückt. Dieser Test beweist eine GSK-3-inhibitorische Aktivität der Paullonderivate in einem auf Humanzellen basierenden Modell.



Abbildung 6-5: Abnahme der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung unter Paulloneinfluss<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Die Werte beziehen sich auf den Grad der  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung in unbehandelten Zellen. Die Messwerte wurden von L. Meijer und Mitarbeitern, Roscoff (Frankreich) ermittelt. Diagramm modifiziert nach dem Original von L. Meijer, Roscoff (Frankreich).

## 7. Protektion und Proliferationsinduktion von INS-1E- und pankreatischen $\beta$ -Zellen durch GSK-3-Inhibitoren

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die GSK-3 ein mögliches Target für  $\beta$ -Zell-protective Therapien sein könnte.<sup>218</sup> Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine simultane Unterdrückung der Expression von GSK-3 $\alpha$  und  $\beta$  mittels small double-stranded RNA interference (siRNA) in INS-1E-Zellen zu einer Proliferation dieser Zellen führte.<sup>17</sup> Diese Effekte konnten durch die Inhibition der GSK-3 mittels geeigneter Inhibitoren bestätigt werden: Verschiedene GSK-3-Inhibitoren schützen INS-1E-Zellen und  $\beta$ -Zellen aus isolierten Ratten-Inselzellen vor Apoptose und steigern die Proliferation der Zellen.<sup>17</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Vertreter der neuartigen Azapaullon-GSK-3-Inhibitoren ebenfalls auf  $\beta$ -Zell-regenerative Effekte hin untersucht werden. Dabei wurden die ausgewählten Verbindungen zunächst auf ihre zellprotective Wirkung getestet. Die in diesen Tests potentesten Derivate wurden weiter evaluiert und bezüglich ihrer antiapoptotischen und proliferationssteigernden Wirkung auf INS-1E-Zellen überprüft. Nachfolgend wurden die dabei besonders aktiven Vertreter in einem physiologisch relevanteren System weiter untersucht, in dem die Proliferationsanregung von  $\beta$ -Zellen in isolierten Ratteninseln aus Pankreasgewebe beobachtet wurde. In allen Tests diente 1-Azakenpaullon (**2a**) als Positivkontrolle. Alle in Abschnitt 7 beschriebenen Untersuchungen wurden von R. Mußmann und Mitarbeitern, Firma DeveloGen, Göttingen durchgeführt.

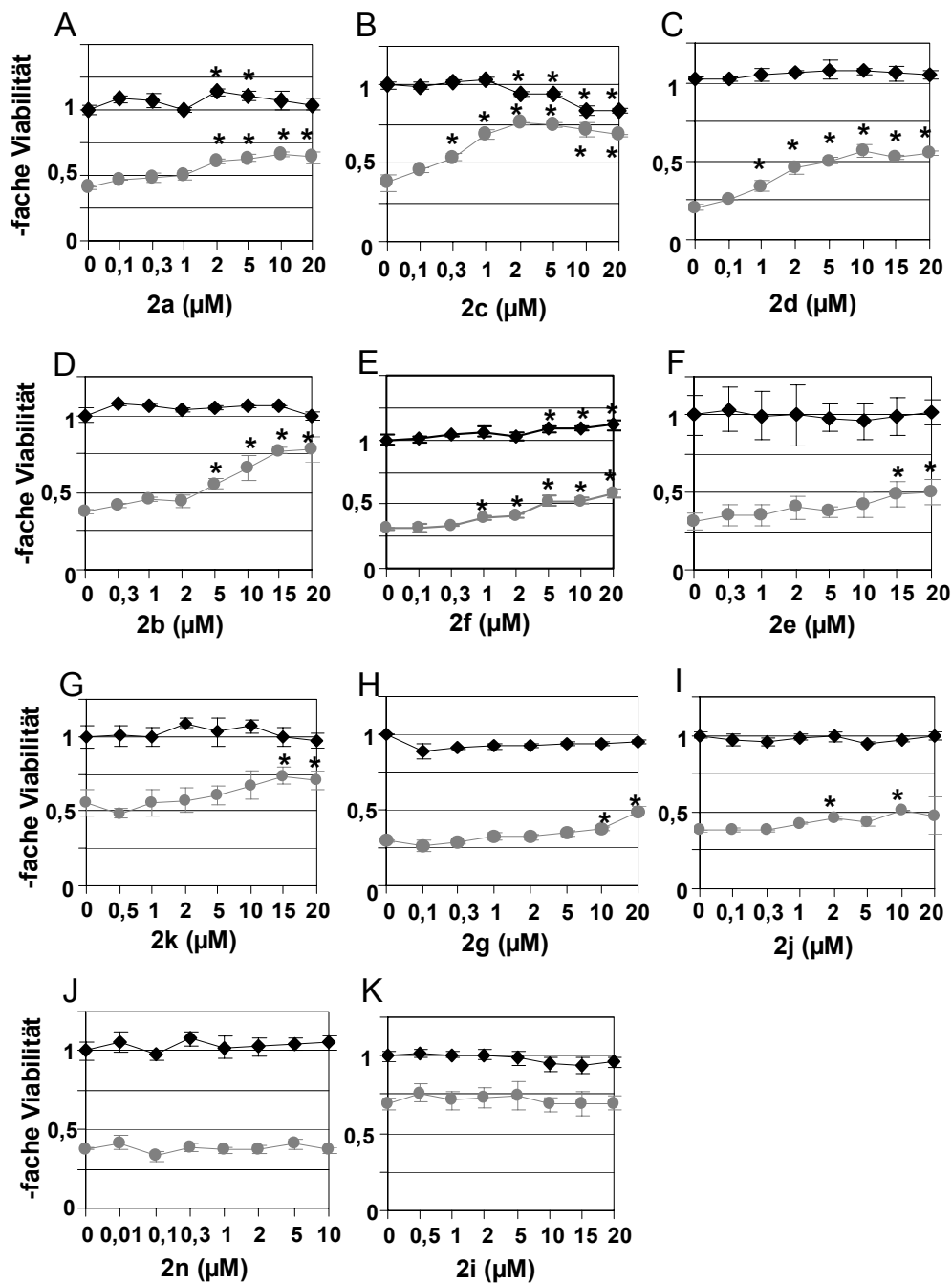
### 7.1 Zellprotective Wirkung von 1-Azapaullonen

In Abbildung 7-1 ist die zellprotective Wirkung von ausgewählten 1-Azapaullonen dargestellt (graue Linien mit grauen Kreisen). Dabei wurden INS-1E-Zellen mit toxischen Konzentrationen an Glucose (25 mM) und Palmitat (0,3 mM Palmitat gebunden an bovines Serumalbumin (BSA)) versetzt und mit den Inhibitoren kultiviert. Diese Glucolipotoxizität schädigt  $\beta$ -Zellen und kann zu deren Absterben führen.<sup>219</sup> Die metabolische Aktivität wurde wie im Experimentellen Teil beschrieben

bestimmt; sie stellt ein indirektes Maß der mitochondrialen Energieproduktion dar. Die Effekte der getesteten Verbindungen auf INS-1E-Zellen, die nicht mit dem toxischen Medium behandelt wurden, sind ebenfalls dargestellt (schwarze Linie mit schwarzen Kreisen).

Die Ergebnisse der in Abbildung 7-1 dargestellten Tests deuten auf zellprotektive Eigenschaften einiger 1-Azapauillone hin. Starke protektive Effekte gehen von den Verbindungen **2b-d** und **f** aus, die ebenfalls im Kinase-Assay an GSK-3 sehr starke Hemmaktivitäten bewiesen hatten (Abbildung 7-1, B-E). Die Verbindungen **2e**, **g**, **k** und **j** zeigen moderat protektive Effekte (Abbildung 7-1, F-I), während sich die schwächeren GSK-3-Inhibitoren **2n** und **i** neutral verhalten (Abbildung 7-1, J-K). Die bisher potentesten 1-Azapauillone, das 9-Carbonitril-Derivat **2c** und das 9-Trifluormethyl-Derivat **2d**, zeigen die stärksten protektiven Effekte, wobei **2c** eine über zweifache Steigerung der Viabilität schon bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  erreicht (Abbildung 7-1, B). Ähnliche Effekte ergeben andere 1-Azapauillone, wenn überhaupt, nur bei deutlich höheren Konzentrationen (Abbildung 7-1, D, G). Bei höheren Konzentrationen von **2c** sinkt die Viabilität von behandelten und unbehandelten INS-1E-Zellen ab, was auf einen engen Konzentrationsbereich schließen lässt, in dem **2c** protektive Wirkung zeigt. Sehr viel toxischere Effekte werden in diesem Test unter gleichen experimentellen Bedingungen von den GSK-3-Inhibitoren BIO (**17**)<sup>101</sup> und der Substanz AR-A014418 (**18**)<sup>65</sup> berichtet, wobei bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  an **17** keine Viabilität der INS-1E-Zellen mehr zu beobachten ist<sup>17</sup>.

Abbildung 7-1: Protektive Effekte von 1-Azapaullonen gegenüber INS-1E-Zellen<sup>a</sup>

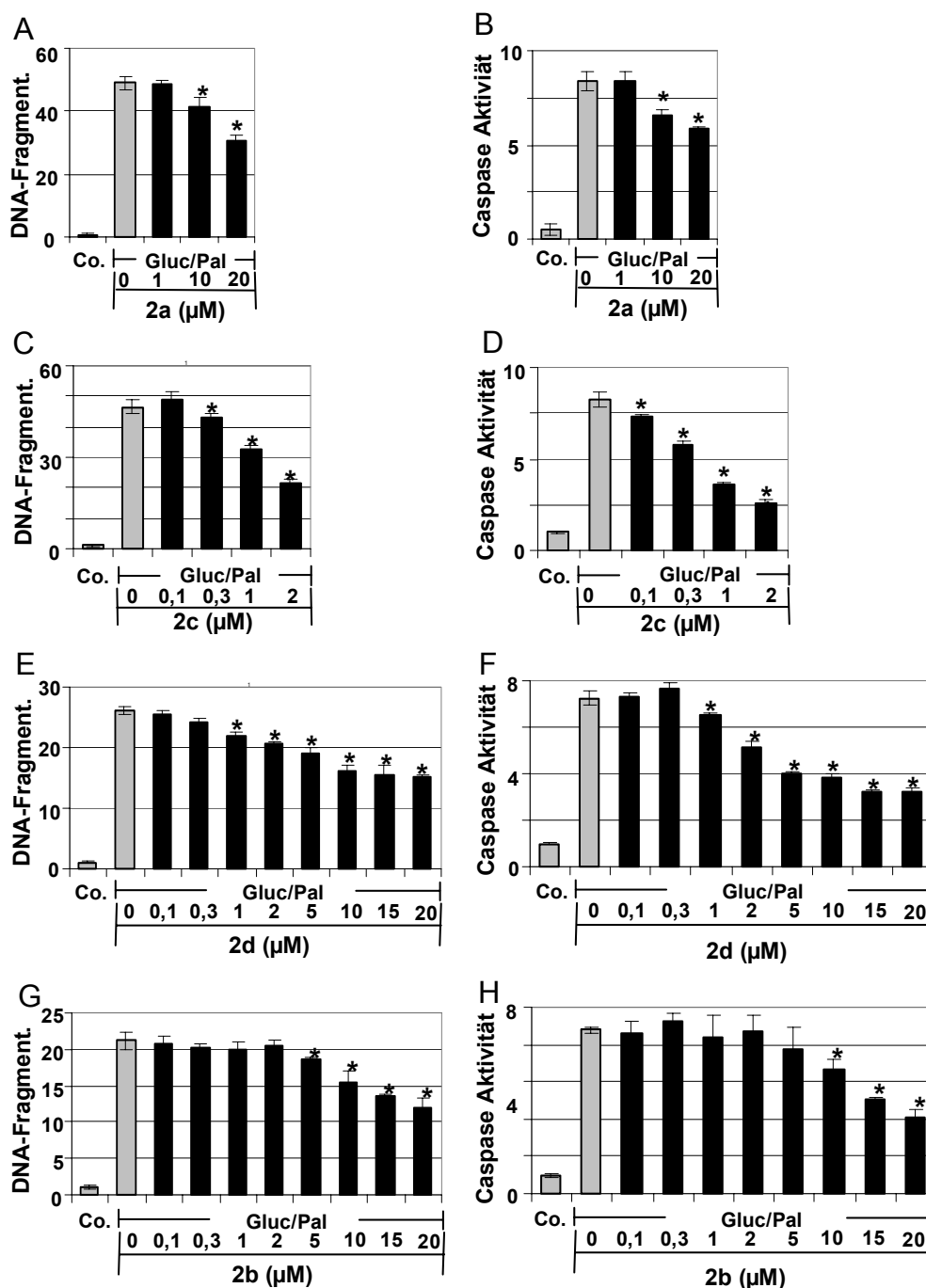


<sup>a</sup>modifiziert nach R. Mußmann, Firma DeveloGen, Göttingen. Die Abbildung zeigt repräsentative Daten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von gemessenen Daten aus mindestens vier Kavitäten. Die Werte geben die Änderung der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle  $\pm$  SD an. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (Student t-Test). \*  $p < 0,05$  gegen INS-1E-Zellen, die mit toxischem Medium und ohne Inhibitor behandelt wurden. Die Durchführung der Testungen erfolgte durch R. Mußmann und Mitarbeitern, DeveloGen AG, Göttingen.

## 7.2 Antiapoptotische Wirkung von 1-Azapaullonen

Die vier Derivate **2b-d** und **f**, die die besten Ergebnisse in den Viabilitäts-Tests gezeigt hatten, wurden auf ihre antiapoptotische Wirkung hin getestet. Wie schon in den Viabilitätstest wurden INS-1E-Zellen den gleichen toxischen Glucose- und Palmitatkonzentrationen ausgesetzt. Zur Kontrolle der induzierten Apoptose wurden die Level der cytosolischen DNA-Fragmente und die Aktivität der Caspasen bestimmt. Die Messungen wurden gegen unbehandelte Kontrollen durchgeführt, deren geringe apoptotische Vorgänge ebenfalls unter den Versuchsbedingungen detektiert werden konnten (Abbildung 7-2, Co.). Das toxische Medium induzierte eine starke Apoptose, wie aus Abbildung 7-2 zu entnehmen ist (grauer Balken bei 0  $\mu\text{M}$  zugesetztem Inhibitor). Die genaue Durchführung der Testungen ist im Experimentellen Teil beschrieben.

Die vier Derivate bewiesen in diesem Test starke zellprotektive Eigenschaften, wobei die Ergebnisse von 1-Azakenpaullon (**2a**) reproduziert werden konnten<sup>52</sup>. Das Trifluormethyl-Derivat **2d** und das 9-Fluor-substituierte Derivat **2b** zeigten ein ähnliches gutes Wirkprofil wie 1-Azakenpaullon (Abbildung 7-2, A-B, E-H). **2c** war in der Lage, bei einer 2 mikromolaren Konzentration den durch Glucolipotoxizität induzierten Zelltod um über 50 % zu senken und stellt auch in diesem Test das potenteste aller getesteten Derivate dar (Abbildung 7-2, C-D). Dies wird besonders deutlich, wenn man die Ergebnisse von BIO (**17**) und dem GSK-3-Inhibitor CT99021 (**21**) im Vergleich zu **2c** betrachtet. Der präklinisch optimierte Chiron-Inhibitor **21**<sup>68</sup> erreicht bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  eine 35-prozentige Senkung der apoptotischen Vorgänge, während bei einer 2 mikromolaren Konzentration kein Absinken der Apoptose zu beobachten ist.<sup>17</sup>

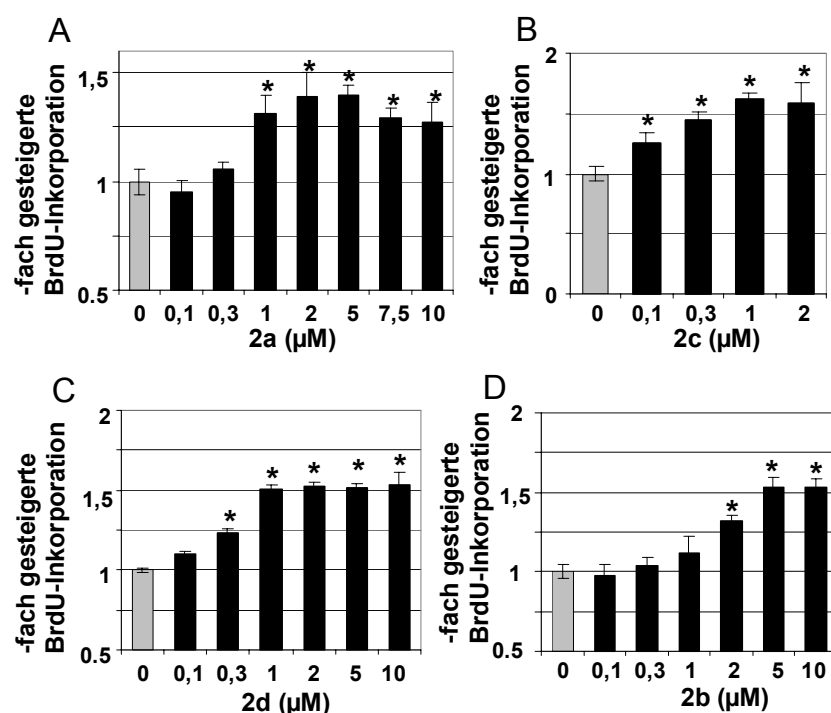
Abbildung 7-2: Antiapoptotische Wirkung von 1-Azapaullonen<sup>a</sup>

<sup>a</sup>modifiziert nach R. Mußmann, Firma DeveloGen, Göttingen. Die Abbildung zeigt repräsentative Daten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von gemessenen Daten aus mindestens vier Kavitäten. Die Werte geben die Änderung der DNA-Fragmentierung und der Caspase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle  $\pm$  SD an. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (Students t-Test). \*  $p < 0,05$  gegen INS-1E-Zellen, die mit toxischem Medium und ohne Inhibitor behandelt wurden. Die Durchführung der Testungen erfolgte durch R. Mußmann und Mitarbeitern, Firma DeveloGen AG, Göttingen.

### 7.3 Proliferationssteigernde Wirkung von 1-Azapauillonon auf INS-1E-Zellen

Neben den beschriebenen zellprotektiven Eigenschaften wurden **2b-d** auf ihre proliferationssteigernde Wirkung auf INS-1E-Zellen hin untersucht. Diese Wirkung ist für 1-Azakenpauillon (**2a**) beschrieben<sup>17</sup> und sollte reproduziert werden. Dafür wurden die Zellen für 24 Stunden mit den ausgewählten Derivaten in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Die Proliferationsrate wurde durch Messung der Inkorporation des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) bestimmt, wobei die Menge an aufgenommenem BrdU proportional zur Zellproliferation ist. Als Referenz dienen Zellen, die nicht mit einem GSK-3-Inhibitor inkubiert wurden. Deren Proliferation wurde nach 24 Stunden gleich eins gesetzt (Abbildung 7-3, grauer Balken) und diese mit der durch die Derivate **2a-d** hervorgerufenen Proliferationsraten (Abbildung 7-3, A-D) verglichen.

In dieser Studie erzielten **2c** und **d** die besten Ergebnisse (Abbildung 7-3, B-C). **2c** bewirkte schon einen signifikanten Anstieg der Proliferation bei 0,1  $\mu\text{M}$  (Abbildung 7-3, B). Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  wird bei beiden Derivaten eine 1,5fache Steigerung der Proliferation beobachtet. Ähnliche Steigerungsraten werden bei **2a** und **b** erst in Konzentrationsbereichen von 2 - 5 bzw. 5 - 10  $\mu\text{M}$  erreicht (Abbildung 7-3, A, D).

Abbildung 7-3: 1-Azapaulлоне steigern die Proliferation von INS-1E-Zellen<sup>a</sup>

<sup>a</sup>modifiziert nach R. Mußmann, Firma DeveloGen, Göttingen. Die Abbildung zeigt repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Versuchen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von gemessenen Daten aus mindestens vier Wells. Die Werte geben die relative Änderung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle  $\pm$  SD an. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (Students t-Test). \*  $p < 0,05$  gegen INS-1E-Zellen, die ohne Inhibitor behandelt wurden. Die Durchführung der Testungen erfolgte durch R. Mußmann und Mitarbeitern, DeveloGen AG, Göttingen.

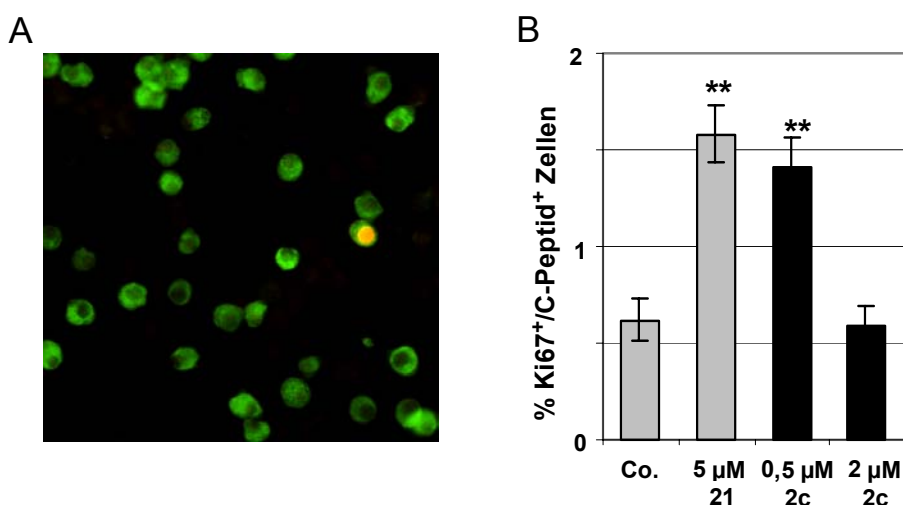
## 7.4 Proliferationssteigernde Wirkung von 1-Azapaulloenen auf $\beta$ -Zellen aus isolierten Ratteninseln

Aufgrund der sehr guten Resultate aus den vorangegangenen Testungen sollte **2c** an  $\beta$ -Zellen aus isolierten Ratteninseln getestet werden. Auch hier sollte eine mögliche zellproliferationssteigernde Wirkung von **2c** überprüft werden. Als Vergleich diente der Chiron-Inhibitor **21**. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den Inhibitoren kultiviert, disaggregiert und auf Objektträgern fixiert. Danach wurden die Zellen markiert und durch Doppelimmunofluoreszenz-Mikroskopie einer Auszählung zugänglich gemacht. Die sich in Teilung befindlichen  $\beta$ -Zellen wurden mit



Antikörpern gegen das C-Peptid (ein Fragment von Proinsulin, Abbildung 7-4, A gelb) und gegen den nukleären Proliferationsmarker Ki67 markiert (Abbildung 7-4, A grün). Der Quotient aus Ki67 positiven und C-Peptid positiven Zellen stellt die Fraktion der sich in Teilung befindlichen  $\beta$ -Zellen dar.  $\beta$ -Zellen, die nicht mit Inhibitor behandelt wurden, sind als Kontrolle mitaufgeführt.

Abbildung 7-4:      **2c** steigert die Proliferation von  $\beta$ -Zellen aus isolierten Ratteninselzellen<sup>a</sup>



<sup>a</sup>modifiziert nach R. Mußmann, Firma DeveloGen, Göttingen. Die Abbildung B zeigt repräsentative Daten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken sind  $\pm$  SD angegeben. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (Student t-Test). \*\*  $p < 0,01$  gegen die Kontrolle (Co.). Die Durchführung der Testungen erfolgte durch R. Mußmann und Mitarbeitern, DeveloGen AG, Göttingen.

Die Chiron-Verbindung **21** zeigt bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M einen 2,5fachen Anstieg der Proliferation (Abbildung 7-4, B). Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten überein.<sup>17</sup> Bei einer 10fach geringeren Konzentration erreicht **2c** etwa die gleiche Proliferationssteigerung wie **21** (Abbildung 7-4, B). Der Rückgang der Proliferationsrate von **2c** bei 2  $\mu$ M resultiert vermutlich aus off-target-Effekten, die die positiven Einflüsse von **2c** neutralisieren.

Es lässt sich festhalten, dass die neuartigen 1-Azapauillone starke zellprotektive und antiapoptotische Eigenschaften besitzen. Neben **2b** und **d** wies vor allem das

Derivat **2c** ausgeprägte proliferationssteigernde Wirkung auf, was an zwei verschiedenen Zellmodellen gezeigt werden konnte.

## 8. Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pax4

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, ist der Transkriptionsfaktor Pax4 wichtig für die  $\beta$ -Zellentwicklung des Pankreas. Die Überexpression dieses Faktors fördert das Überleben und die Replikation von ausgereiften murinen und humanen  $\beta$ -Zellen in Mäusen.<sup>58</sup> Eine 50-prozentige Senkung der Pax4-Expression resultiert in einer erhöhten Apoptose-Rate von INS-1E-Zellen, was ein Hinweis auf  $\beta$ -zellprotektive Funktionen ist. Um zu überprüfen, ob die antiapoptotische Wirkung von **2c** mit Pax4 zusammenhängt, wurde dessen Expression in INS-1E-Zellen und pankreatischen Ratteninseln bestimmt. In Tabelle 8-1 erkennt man die mittels quantitativer reverser-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ermittelten Expressionslevel von Pax4 und dem Kontrollgen Cyclophilin B (CypB) nach 4 und 24 stündiger Kultivierung mit verschiedenen GSK-3-Inhibitoren bzw. dem Wachstumsfaktor Activin-A.

Gerade in INS-1E-Zellen ist die durch **2c** (1  $\mu$ M) induzierte mRNA-Expression von Pax4 besonders ausgeprägt und könnte mit der ebenfalls beobachteten starken antiapoptotischen Wirkung von **2c** auf INS-1E-Zellen assoziiert sein (Tabelle 8-1, A). Die Pax4-Expression ist ebenfalls in  $\beta$ -Zellen aus isolierten Ratteninseln durch **2a** und **c** erhöht (Tabelle 8-1, B). Des Weiteren zeigen Alsterpaullon (**1b**) und 1-Azakenpaullon (**2a**) expressionssteigernde Effekte, jedoch bei deutlich höheren Konzentrationen, während **2b** sowie die weiteren GSK-3-Inhibitoren **17** und **21** keinen Anstieg hervorrufen (Tabelle 8-1, A).

Activin-A, ein Wachstumsfaktor aus der TGF- $\beta$ -Familie, der die Pax4-Expression steigert,<sup>58</sup> diente bei den Versuchen als Positivkontrolle. Während Activin-A auch nach einer 24 stündigen Kultivierung hohe Pax4-Expressionslevel bewirkte, fiel die Expression bei Behandlung mit **2c** nach 24 h auf 50 % des Kontrollwertes ab. Die Ursache hierfür ist unklar, ebenso die Rolle der GSK-3-Inhibition bei der Pax4-Transkriptions-Aktivierung. Da strukturell unterschiedliche GSK-3-Inhibitoren, wie **17** oder **21**, keine gesteigerte Pax4-Expression bewirken, scheint die Inhibition der GSK-3 zumindest nicht die ausschließliche Ursache der Pax4-Transkriptions-Aktivierung zu sein. Vielmehr scheinen die 1-Azapaulone **2a** und **c** sowie

Alsterpaullon (**1b**) mit einem weiteren Target zu interagieren, welches in die Pax4-Regulation involviert ist und auf die Molekülstruktur der Paullone anspricht.

Tabelle 8-1: Expressionslevel von Pax4 und dem Kontrollgen CypB<sup>a</sup>

**A**

Getestete Moleküle	Relative Genexpression analysiert mit qRT-PCR			
	Pax4		CypB	
	4 h	24 h	4 h	24 h
Co.	1,00 ( $\pm 0,15$ )	1,08 ( $\pm 0,47$ )	1,00 ( $\pm 0,11$ )	1,00 ( $\pm 0,32$ )
Activin-A (1 nM)	3,38 ( $\pm 0,34$ )*	4,31 ( $\pm 0,12$ )	1,04 ( $\pm 0,12$ )	1,12 ( $\pm 0,18$ )
<b>2a</b> (10 $\mu$ M)	1,87 ( $\pm 0,14$ )*	0,8 ( $\pm 0,16$ )	1,22 ( $\pm 0,1$ )	1,14 ( $\pm 0,22$ )
Alsterpaullon ( <b>1b</b> ) (12,5 $\mu$ M)	7,1 ( $\pm 0,4$ )*	1 ( $\pm 0,25$ )	1,3 ( $\pm 0,14$ )	1,1 ( $\pm 0,2$ )
<b>2c</b> (1 $\mu$ M)	4,87 ( $\pm 1,06$ )*	0,56 ( $\pm 0,23$ ) *	1,11 ( $\pm 0,32$ )	1,42 ( $\pm 0,51$ )
<b>2b</b> (10 $\mu$ M)	0,97 ( $\pm 0,12$ )	0,45 ( $\pm 0,22$ )*	1,14 ( $\pm 0,23$ )	0,97 ( $\pm 0,16$ )
<b>21</b> (10 $\mu$ M)	0,78 ( $\pm 0,24$ )	0,76 ( $\pm 0,31$ )	1,31 ( $\pm 0,48$ )	1,12 ( $\pm 0,03$ )
<b>17</b> (1 $\mu$ M)	1,02 ( $\pm 0,1$ )	0,81 ( $\pm 0,12$ ) *	1,04 ( $\pm 0,1$ )	1,2 ( $\pm 0,2$ )

**B**

β-Zellen aus isolierten Ratteninselzellen	Relative Genexpression analysiert mit qRT-PCR	
	4 h	
Getestete Moleküle	Pax4	CypB
Co.	1,00 ( $\pm 0,1$ )	1,00 ( $\pm 0,12$ )
<b>2a</b> (10 $\mu$ M)	2,8 ( $\pm 0,1$ )*	1,00 ( $\pm 0,35$ )
<b>2c</b> (2 $\mu$ M)	2,4 ( $\pm 0,4$ )*	0,73 ( $\pm 0,15$ )

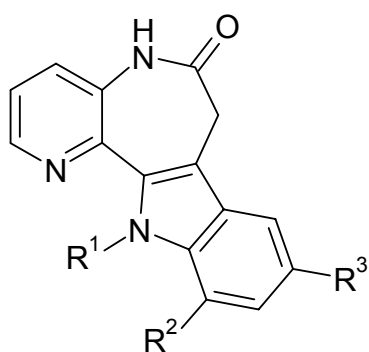
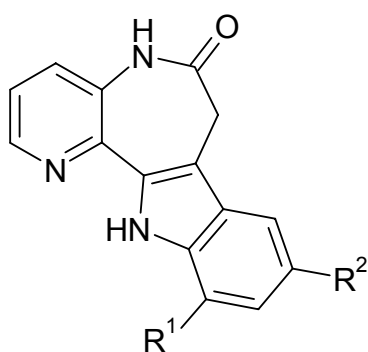
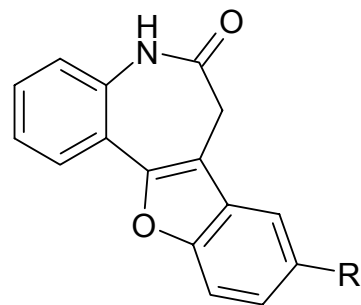
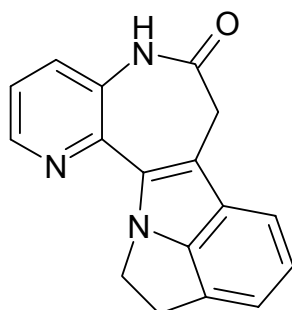
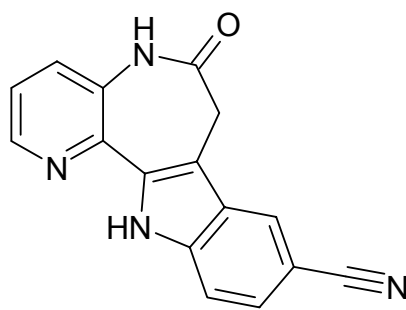
<sup>a</sup>modifiziert nach R. Mußmann, Firma DeveloGen, Göttingen Die Tabelle A zeigt repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Versuchen, Tabelle B aus 4 gleichen Versuchen. Die Werte geben die Änderung im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Kontrolle an. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Messungen  $\pm$  SD. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (Students t-Test). \*  $p < 0,05$  gegen die Kontrolle (Co.). Die Durchführung der Testungen erfolgte durch R. Mußmann und Mitarbeitern, DeveloGen AG, Göttingen.

## 9. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neuartige ATP-kompetitive GSK-3-Inhibitoren vom Paullon-Typ dargestellt. Durch Kenntnis der strukturellen Gegebenheiten der ATP-Bindetasche war ein rationales Drug-Design möglich, welches zusätzlich durch Docking-Experimente gestützt wurde. Die aus dem Design-Prozess gewonnenen Erkenntnisse über sinnvolle, die Aktivität steigernde Derivatisierungen wurden in der nachfolgenden Planung der Synthesestrategien berücksichtigt. Verschiedene Substitutionsmuster und Derivatisierungen am heterozyklischen Grundgerüst der Paullone wurden chemisch erschlossen. Insbesondere wurde eine systematische Abwandlung der Substituenten  $R^1$  und  $R^2$  am Grundgerüst der 1-Azapaulone **2** durchgeführt. Weiterhin wurden erstmals Vertreter mit den neuen Ringsystemen der 2-Azapaulone **3**, der 12-Oxapaulone **4**, sowie das 5,7,11,12-Tetrahydro-6*H*-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]pyrrolo[3,2,1-*h*]indol-6-on (**2s**) synthetisiert.

Die dargestellten Verbindungen wurden bei Kooperationspartnern in einem umfangreichen Screening aus biochemischen und zellbasierten Assays evaluiert. Den Ausgangspunkt markierte ein Test der inhibitorischen Wirkung der Verbindungen an verschiedenen Kinasen bzw. Kinasekomplexen (CDK1/Cyclin B, CDK5/p25, GSK-3, CDK2/Cyclin A, Dyrk1a). Im Anschluss daran folgte eine Bewertung der zellprotektiven und antiapoptotischen Eigenschaften einiger Vertreter gegenüber INS-1E-Zellen, die einem toxischen Milieu aus hohen Glucose- und Palmitatkonzentrationen ausgesetzt waren. Des Weiteren wurde die proliferationsanregende Wirkung von bestimmten Derivaten auf INS-1E- und  $\beta$ -Zellen aus isolierten Ratteninseln untersucht.

In diesen Tests zeigten verschiedene Paullonderivate neben starker Kinase-inhibitorischer Aktivität, ebenfalls ausgeprägte regenerative Effekte in  $\beta$ -Zellen bzw.  $\beta$ -Zellmodellen. In allen Tests überzeugte das 1-Azapaulon-9-carbonitril **2c** mit dem jeweils stärksten Wirkprofil.

**2****3****4****2s****2c**

Um erste Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus der Paullonderivate bezüglich der  $\beta$ -Zell-regenerativen Effekte zu bekommen, wurde **2c** weiteren Tests unterworfen. Dabei zeigte sich, dass **2c** in der Lage war, die Expression des für die Organogenese des Pankreas wichtigen Transkriptionsfaktor Pax4 zu steigern, dessen Überexpression zu Replikation von humanen und murinen  $\beta$ -Zellen führt.

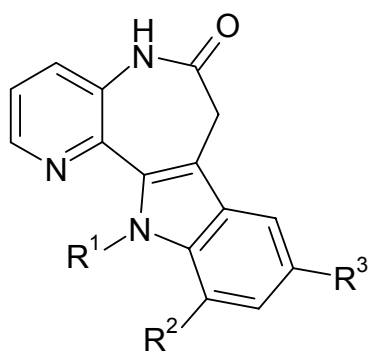
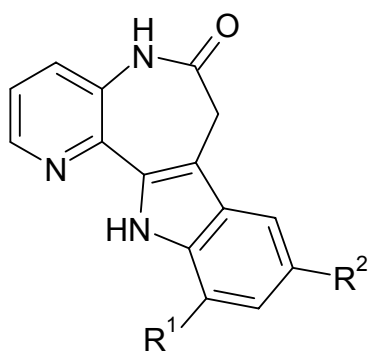
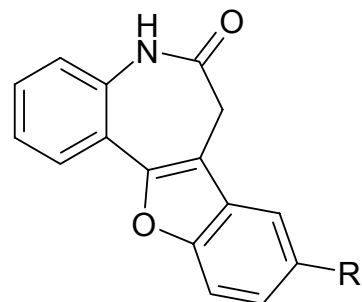
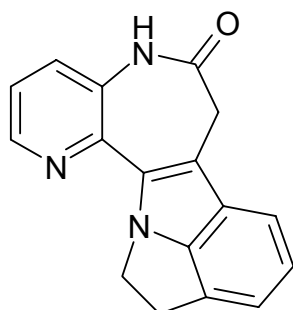
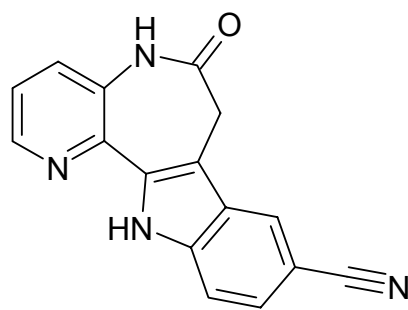
## 10. Summary

In the context of this work novel ATP-competetive Paullone-GSK-3-inhibitors were synthesized. Structural insights into the ATP-binding cleft allowed a rational drug design approach, which was supported by docking experiments. This process provided insights indicating beneficial derivatisations which had direct influence on the synthetic procedures of the compounds. Several substitution patterns and derivatisations on the heterocyclic scaffold were conducted. In particular, a systematic modification of the substituents  $R^1$  and  $R^2$  at the azapaullone basic scaffold **2** was performed. Furthermore, derivatives of the novel cyclic ring system of the 2-azapaullones **3**, 12-oxapaullones **4**, and the 5,7,11,12-tetrahydro-6*H*-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]pyrrolo[3,2,1-*h*]indol-6-one (**2s**) were synthesized.

The obtained compounds were screened by collaboration partners in several biochemical and cell-based assays. First, the compounds were tested for kinase-inhibitory activity against a panel of kinases (CDK1/Cyclin B, CDK5/p25, GSK-3, CDK2/Cyclin A, Dyrk1a). Subsequently, the compounds were evaluated regarding their antiapoptotic and cell-protective features in INS-1E cells, which were exposed to a toxic environment containing glucose and palmitate. Furthermore, some derivatives were assessed concerning their ability to induce proliferation in INS-1E- and  $\beta$ -cells of isolated rat islets.

Throughout theses assays some of the novel paullones exhibited strong kinase-inhibitory activity and pronounced regenerative effects in  $\beta$ -cells and  $\beta$ -cell surrogates. In all biological tests, **2c** turned out to be the most promising new derivative.



**2****3****4****2s****2c**

In order to examine a possible mode of action, regarding the  $\beta$ -cell-regenerative potential of the paullone derivatives, **2c** was employed for further investigations. It was shown that **2c** is able to induce the expression of Pax4.

This transcription factor is associated with pancreatic development and its overexpression resulted in enhanced replication rates of human and murine  $\beta$ -cells.

## 11. Experimenteller Teil

### 11.1 Allgemeines

#### **Dünnschichtchromatographie:**

DC-Mikroarten Polygram<sup>®</sup> Sil G/UV<sub>254</sub>, 40 x 80 mm, Fa. Macherey-Nagel. Detektion unter UV-Licht bei 254 und 366 nm.

#### **Elementaranalysen:**

CE Instruments FlashEA<sup>®</sup> 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest.

#### **Analytische Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC):**

Merck/Hitachi LaChrom Elite: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Trennsäule Merck LiChroCART 125-4, LiChrosphere 100, RP 18, 5 µm, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Probenvorbereitung: ca. 1 mg Substanz wird in 500 µl DMSO gelöst, die Lösung wird anschließend mit DMSO 1:5 verdünnt.

Injektionsvolumen: 10 µl; Flussrate: 1.000 ml/min; isokratisch; Detektion: 254/280 nm; Gesamtlaufzeit: 15 bzw. 20 min; Nettoretentionszeit ( $t_s$ ), Totzeit ( $t_m$ ) bezogen auf DMSO; Elutionsmittel: ACN:H<sub>2</sub>O- und ACN:H<sub>2</sub>O/TFA-Gemische (pH 2.11 bzw. pH 2.55)

Herstellung H<sub>2</sub>O/TFA (pH 2.11 bzw. pH 2.55): Aqua bidest mit Trifluoressigsäure auf pH 2.11 bzw. pH 2.55 eingestellt.

#### **Präparative Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC):**

Merck LaPrep: LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, Probenschleife der Firma Knauer (max. Injektionsvolumen 5 ml), LaPrep P216 Fraction Collector, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep/WellChrom für EZChrom.

Säulenrohr Merck: Länge 125 mm, Innendurchmesser 25 mm, gekoppelt an einen Merck Selbstfüllstand NW25.

Säulenmaterial Merck: LiChospher<sup>®</sup> 100 RP-18, 12 µm.

Flussrate: 40 ml/min, Detektion bei 254 nm.

**IR-Spektren:**

Thermo Nicolet FT-IR 200 (vermessen als KBr-Preßlinge), Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA.

**Kernresonanzspektroskopie:**

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz bzw. 600 MHz) und  $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz bzw. 150.9 MHz):

Bruker Avance DRX-400 bzw. Bruker Avance II-600 (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, einschließlich der DEPT, HSQC und HMBC-Spektren).

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS).

Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der  $\delta_{\text{TMS}}$ -Skala; Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration;

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = triplett, q = Quartett, m = multipllett. Die Angabe der Signalmultiplizitäten in Anführungsstrichen bedeutet, dass es sich um eine scheinbare Multiplizität handelt, die nicht direkt aus der Struktur unter Anwendung der Regeln für Spektren erster Ordnung abgeleitet werden kann.

Bei den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten weist der Zusatz (2C) auf ein überlagertes Signal magnetisch äquivalenter  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffatome hin. Die Spektren wurden  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelt aufgenommen.

**Massenspektrometrie:**

Finnigan-MAT 95 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig). Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV, hochauflösendes Massenspektrum (HRMS).

**Synthese-Mikrowelle:**

CEM Fokussiertes Mikrowellen™ Synthese System, Typ Discover; ChemDriver™-Application Software Program; Reaktionsgefäße: 10 ml mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4; Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

**Röntgenkristallstrukturanalysen:**

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD (Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig)) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K $\alpha$ -Strahlung gemessen.

Strukturlösung: direkte Methoden.

Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten: siehe Kapitel 10.2  
Synthese/Analytische Daten Röntgenographische Daten.

Programmsystem: SHELXL-97 (G. M. Sheldrick, Göttingen)

**Säulenchromatographie:**

Kieselgel 60 Å (unter 0,063 mm), Fa. Merck.

**Schmelzpunkte:**

IA 9100, Fa. Barnstead Electrothermal, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien

**Reinigung und Trocknung von Lösungsmitteln:**

Die Reinigung und Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte nach publizierten Methoden.<sup>220</sup>

## 11.2 Synthese/Analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1) zur Synthese der 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-(phenylhydrazon) **45a-h, I-n**, der 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion-5-(phenylhydrazon) **52a,c-d** und des 4-[2-(2-Brom-6-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitrils (**90**)

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) (1 mmol) bzw. 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) (1 mmol) bzw. 2-Brom-7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43b**) (1.0 mmol) und ein entsprechend substituiertes Phenylhydrazin **44a-h, I-n** (1.5 mmol), [(respektive ein entsprechend substituiertes Phenylhydrazin-Hydrochlorid (1.1 mmol) und Natriumacetat (1.1 mmol)] werden in Eisessig (10 ml) für 15 - 80 Minuten bei 70 °C gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch überwacht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf 5-prozentige Natriumacetat-Lösung (40 ml) gegossen. Ein sich bildender Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2) zur Synthese der 7,12-Dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **2a-h, I-n**, der 7,12-Dihdropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **3c-d** und des 2-Brom-6-oxo-7,12-dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-carbonitrils **91**

Ein nach AAV1 synthetisiertes 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-(phenylhydrazon) **45a-h, I-n** (1.0 mmol) bzw. 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion-5-(phenylhydrazon) **52c-d** (1.0 mmol) bzw. 4-[2-(2-Brom-6-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril (**90**) (1.0 mmol) wird in 90 ml Diphenylether unter Stickstoffbegasung für 2 - 5 Stunden refluxiert. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch überwacht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur gießt man auf 150 ml n-Hexan. Der entstehende Niederschlag wird mit *viel* Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV3) zur Synthese der 7,12-Dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **3a, b, d-e, i**

3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) (1 mmol) und ein entsprechend substituiertes Phenylhydrazin **44a, b, d-e, i** (1.5 mmol), [(respektive ein entsprechend substituiertes Phenylhydrazin-Hydrochlorid (1.1 mmol) und Natriumacetat (1.1 mmol)] werden in Eisessig (10 ml) für 60 Minuten bei 70 °C gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch überwacht. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen und gibt wenige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zu. Anschließend wird der Ansatz bei 90 °C für 2 - 5 Stunden weiter gerührt. Nach der Umsetzung wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und auf 40 ml 5-prozentige Natriumacetat-Lösung gegossen. Ein sich bildender Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV4) zur Synthese der 7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **2a-c, h** und von 9-Brom-7,12-Dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**3a**)

Ein nach AAV1 synthetisiertes 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-(phenylhydrazon) **45** (0.1 mmol) bzw. 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion-5-[(4-bromphenyl)hydrazon] (**52a**) wird in 1 ml Wasser erhitzt. Die Reaktion wird in einem geschlossenen Synthese-Mikrowellen-Reaktionsgefäß bei folgenden Einstellungen durchgeführt: ramp time 5 Minuten, Reaktionszeit 30 Minuten, Temperatur 175 bis 230 °C, Druck unterhalb 295 psi. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV5) zur Synthese der N-12 substituierten 7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **2o-r** und der 7,12-Dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **3o-q**

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) (1 mmol) oder 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) (1 mmol), ein entsprechend substituiertes Phenylhydrazin **44o-r** (1.5 mmol), [(respektive ein entsprechend substituiertes Phenylhydrazin-Hydrochlorid (1.1 mmol) und Natriumacetat (1.1 mmol)] werden in Eisessig (10 ml) für 0,5 - 2 Stunden bei 70 °C gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch überwacht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf 5-prozentige Natriumacetat-Lösung (40 ml) gegossen. Ein sich bildender Niederschlag wird abgesaugt, mit 5-prozentiger Natriumacetat-Lösung und Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

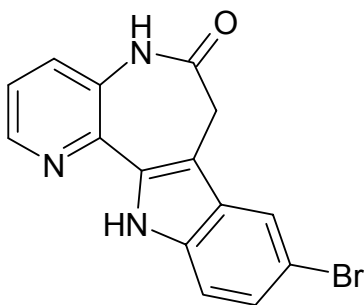
Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV6) zur Synthese der 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-(*O*-phenyloxime) **72a, e, g** und des 7,8-Dihydropyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-(*O*-phenyloxims) (**73g**)

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**) (0,5 mmol) bzw. 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) (1 mmol) und ein entsprechend substituiertes *O*-Phenylhydroxylamin-Hydrochlorid **71a, e, g** (0.55 mmol) und Natriumacetat (0.55 mmol) werden in Eisessig (10 ml) für 1 - 3 Stunden bei 70 °C gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch überwacht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf 40 ml 5-prozentige Natriumacetat-Lösung gegossen. Ein sich bildender Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV7) zur Synthese der 5,7-Dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-d][1]benzazepin-6-one **4a, e, g**

Ein nach AAV6 hergestelltes 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-(*O*-phenyloxim) **72a, e, g** wird in einem Gemisch aus 5 ml Ameisensäure (96 %) und 0.5 ml Phosphorsäure (85 %) bei 60 °C gerührt. Nach 20 - 60 Minuten entsteht ein grauer Niederschlag, der abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen wird.

9-Brom-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2a**)



Methode A:

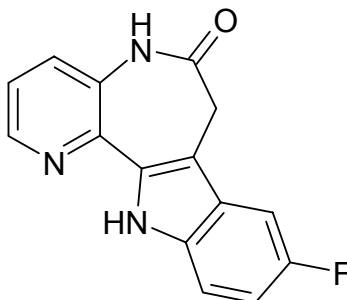
Nach AAV2 erfolgt die Synthese aus 268 mg (0.77 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-bromphenyl)hydrazon] (**45a**). Nach Umkristallisation werden 74 mg (29 %) eines braun-gelben Pulvers erhalten (Lit. 81 %)<sup>150</sup>.

Methode B:

Nach AAV4 erfolgt die Synthese aus 95 mg (0.27 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-bromphenyl)hydrazon] (**45a**) unter Erhalt von 65 mg (73 %) eines braunen Pulvers.

Schmp. >330 °C (Lit. >330 °C)<sup>150</sup>. Die spektroskopischen Daten entsprachen den in der Literatur<sup>150</sup> beschriebenen, unabhängig welches Syntheseverfahren zur Darstellung von **2a** gewählt wurde.



9-Fluor-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2b**)

## Methode A:

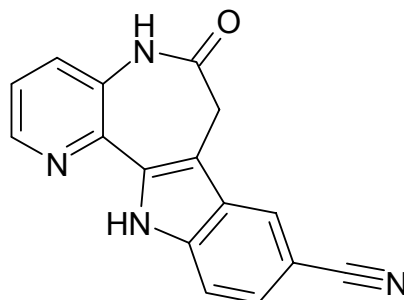
Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 123 mg (0.44 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-fluorphenyl)hydrazon] (**45b**). Nach Umkristallisation erhält man 20 mg (17 %) eines braunen Pulvers.

## Methode B:

Nach AAV4 erfolgt die Synthese aus 29 mg (0.10 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-fluorphenyl)hydrazon] (**45b**) unter Erhalt von 14 mg (51 %) eines braunen Pulvers. Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums für **2b** waren identisch mit denen, die nach AAV2 erhalten wurden.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3194 cm<sup>-1</sup> (NH), 3064 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2976/2917 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1680 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.66 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.04 (ddd, 1H, 9.3/9.1/2.5 Hz, arom.H), 7.40-7.46 (m, 2H, arom. H), 7.54 (dd, 1H, 9.9/2.5 Hz, arom. H), 7.62 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz), 8.48 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.23 (s, 1H, NH), 11.79 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 103.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 23 Hz), 111.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 27 Hz), 112.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 9 Hz), 122.8, 129.4, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 108.9 (d, <sup>4</sup>J<sub>C,F</sub> = 5 Hz), 126.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 10 Hz), 132.2, 134.1, 134.3, 140.1, 157.0 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 232 Hz) (quart. arom. C-Atome), 171.0 (C=O); EI/HRMS (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>3</sub>O) [267.26] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 267.08078, gefunden: 267.08091; Reinheit: 98.2%/98.5% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.00 min, ACN/Wasser: 30/70, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-9-carbonitril (**2c**)



Methode A:

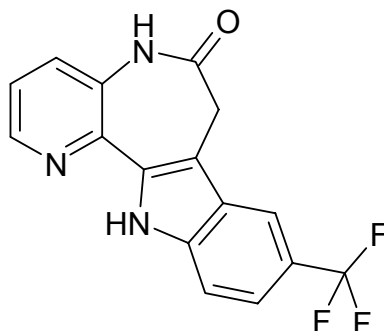
Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 260 mg (0.89 mmol) 4-[2-(6-Oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril (**45c**). Nach Umkristallisation erhält man 44 mg (18 %) eines braunen Pulvers.

Methode B:

Nach AAV4 erfolgt die Synthese aus 28 mg (0.10 mmol) 4-[2-(6-Oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril (**45c**) unter Erhalt von 10 mg (36 %) eines braunen Pulvers. Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums für **2c** waren identisch mit denen, die die nach AAV2 erhalten wurden.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3187 cm<sup>-1</sup> (NH), 3057 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2971 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 2220 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1672 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.76 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.46 (dd, 1H, 8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.53 (dd, 1H, 8.5/1.5 Hz, arom. H), 7.62 (dd, 1H, 8.5/0.5 Hz, arom. H), 7.65 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 8.38 (s, 1H, arom. H), 8.51 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.34 (s, 1H, NH), 12.30 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 113.0, 123.3, 124.6, 125.3, 129.5, 144.4 (tert. arom. C-Atome), 101.2, 109.5, 120.5, 126.2, 132.6, 134.9, 139.0, 139.4 (quart. arom. C-Atome) 171.8 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O) [274.28] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 274.08545, gefunden: 274.01744; Reinheit: 98.8%/99.6% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.49 min, ACN/Wasser: 25/75, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.04 min, AUC = 100%-Methode).

9-Trifluoromethyl-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepin[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2d**)



Methode A:

Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 303 mg (0.90 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[[4-trifluormethyl]phenyl]hydrazon} (**45d**). Nach Umkristallisation erhält man 100 mg (35 %) silberfarbene Nadeln.

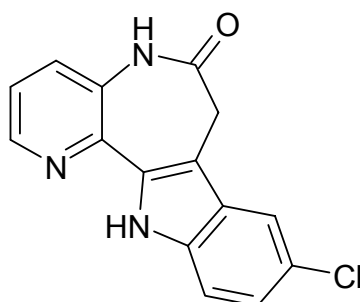
Methode B:

34 mg (0.1 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[[4-trifluormethyl]phenyl]hydrazon} (**45d**) wird in 1 ml DMF erhitzt. Die Reaktion wird in einem geschlossenen Synthese-Mikrowellen-Reaktionsgefäß bei folgender Einstellung durchgeführt: ramp time 5 Minuten, Reaktionszeit 30 Minuten, Temperatur 230 °C, Druck unterhalb 295 psi. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird auf 2 ml Wasser gegossen. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums für **2d** waren identisch mit denen, die die nach AAV2 erhalten wurden.

Schmp: >330 °C; IR (KBr): 3200 cm<sup>-1</sup> (NH), 3067 cm<sup>-1</sup> (CH aromat.), 2978 cm<sup>-1</sup> (CH aliphat.), 1661 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.78 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.44-7.50 (m, 2H, arom. H), 7.64-7.67 (m, 2H, arom. H), 8.20 (s, 1H, arom. H), 8.52 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.31 (s, 1H, NH), 12.21 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) 31.6 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 112.6, 116.5 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 4.3 Hz, C-C-CF<sub>3</sub>), 119.0 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.3 Hz, C-C-CF<sub>3</sub>), 123.1, 129.5, 144.4 (tert. arom. C-Atome), 109.7, 120.0 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 31.3 Hz, C-CF<sub>3</sub>), 125.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 270.3 Hz, CF<sub>3</sub>), 125.6, 132.5, 134.6, 138.8, 139.7 (quart. arom. C-Atome), 170.9 (C=O); C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O [317.27] berechnet: C 60.57, H 3.18, N 13.24, gefunden: C 60.33, H

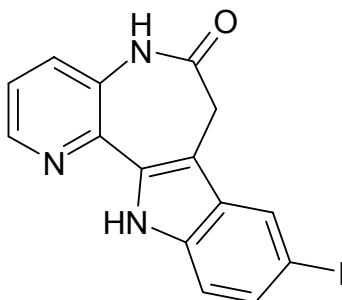
3.15, N 13.03; Reinheit: 99.7%/99.4% (HPLC,  $t_s$  = 8.24 min, ACN/Wasser: 30/70, Säulenofentemperatur 25 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Chlor-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2e**)



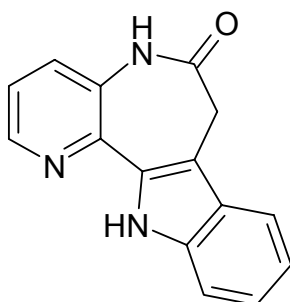
Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 200 mg (0.66 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-chlorphenyl)hydrazon] (**45e**). Nach Umkristallisation erhält man 49 mg (26 %) eines grauen Pulvers.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3429/3191  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3061  $\text{cm}^{-1}$  (CH-arom.), 2975/2916  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1679  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.68 (s, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 7.19 (dd, 1H, 8.6/2.0 Hz, arom. H), 7.43 (dd, 1H, 8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.47 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.63 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 7.82 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 8.49 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.24 (s, 1H, NH), 11.91 (s, 1H, NH),  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 31.6 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 113.4, 117.8, 122.8, 122.9, 129.4, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 108.5, 123.8, 127.3, 132.3, 134.1, 135.8, 139.9 (quart. arom. C-Atome), 170.9 (C=O); EI/HRMS ( $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$ ) [283.72] (m/z) [ $\text{M}^+$ ] berechnet: 283.05124, gefunden: 283.05077; Reinheit: 99.5%/99.3% (HPLC,  $t_s$  = 3.17 min, ACN/Wasser: 40/60, Säulenofentemperatur 25 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Iod-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (2f)

Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 196 mg (0.50 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-iodphenyl)hydrazon] (**45f**). Nach Umkristallisation erhält man 49 mg (26 %) eines grauen Pulvers.

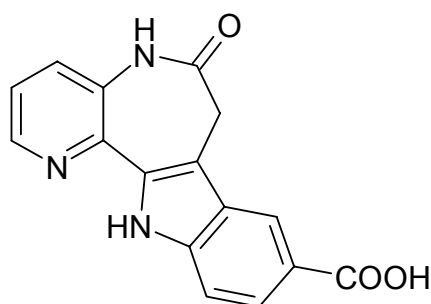
Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3183 cm<sup>-1</sup> (NH), 3057 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2970/2912 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1673 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.66 (s, 1H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.32 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 7.41 – 7.46 (m, 2H, arom. H), 7.62 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 8.12 (d, 1H, 1.4 Hz, arom. H), 8.49 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H) 10.25 (s, 1H, NH), 11.91 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 114.3, 122.9, 127.0, 128.9, 130.7, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 82.7, 108.0, 129.4, 132.3, 133.4, 136.4, 139.9 (quart. arom. C-Atome) 170.9 (C=O); EI/HRMS (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>IN<sub>3</sub>O) [375.17] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 374.98688, gefunden: 374.98620; Reinheit: 94.7%/94.8% (HPLC, t<sub>s</sub> = 4.40 min, ACN/Wasser: 35/65, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (2g)

Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 72 mg (0.27 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-(phenylhydrazon) (**45g**). Nach Umkristallisation erhält man 17 mg (25 %) eines braunen Pulvers.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3054 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2974 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1675 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.66 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.06-7.09 (m, 1H, arom. H), 7.18-7.22 (m, 1H, arom. H), 7.40 (dd, 1H, 8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.47 (d, 1H, 8.2 Hz, arom. H), 7.62 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 7.70 (d, 1H, 8.0 Hz, arom. H), 8.48 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.22 (s, 1H, NH), 11.70 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 111.9, 118.4, 119.1, 122.5, 122.8, 129.3, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 108.9, 126.3, 132.0, 132.5, 137.5, 140.5 (quart. arom. C-Atome), 171.1 (C=O), EI/HRMS (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O) [249.27] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 249.09021, gefunden: 249.08944; Reinheit: 98.8%/97.8% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.25 min, ACN/Wasser: 35/65, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-9-carbonsäure (**2h**)



Methode A:

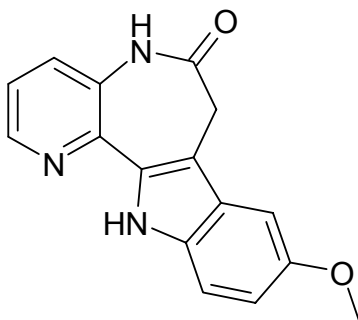
Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 101 mg (0.33 mmol) 4-[2-(6-Oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzoesäure (**45h**). Nach Umkristallisation erhält man 28 mg (29 %) eines schwarzen Pulvers.

## Methode B:

Nach AAV4 erfolgt die Synthese aus 34 mg (0.10 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[[4-trifluormethyl]phenyl]hydrazon} (**45d**) unter Erhalt von 19 mg (64 %) eines braunen Pulvers. Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums für **2h** waren identisch mit denen, die die nach AAV2 erhalten wurden.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3193 cm<sup>-1</sup> (NH), 3066 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2977 cm<sup>-1</sup> / 2923 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1675 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.44 (dd, 1H, 8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.53 (dd, 1H, 9.0/0.4 Hz, arom. H), 7.65 (dd, 1H, 8.3/1.4 Hz, arom. H), 7.83 (dd, 1H, 8.6/1.6 Hz, arom. H), 8.37 (s, 1H, arom. H), 8.50 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.27 (s, 1H, NH), 12.10 (s, 1H, NH), 12.51 (bs, 1H, COOH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.7 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 111.7, 121.0, 122.9, 123.9, 129.4, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 109.9, 121.8, 125.8, 132.4, 134.1, 139.9 (quart. arom. C-Atome), 168.1, 170.7 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) [293.28] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 293.08005, gefunden: 293.07956; Reinheit: 99.2%/99.4% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.99 min, ACN/Wasser: 15/85, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Methoxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2i**)

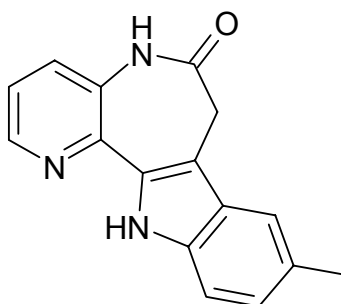


Eine Gemisch aus 484 mg (2.74 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 527 mg (3.02 mmol) 4-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid **44i** und 242 mg (3.02 mmol) Natriumacetat werden in 30 ml Eisessig für 30 Minuten bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf 5-prozentige Natriumacetat-Lösung (120 ml) gegossen. Ein sich bildender Niederschlag wird

abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und in 70 ml Ethanol für 4 Stunden refluxiert. Beim Abkühlen fallen 206 mg (27%) eines farblosen Pulvers aus, welches abgesaugt wird.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3269 cm<sup>-1</sup> (NH), 1669 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.66 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.84 (dd, 1H, 8.8/2.4 Hz, arom. H), 7.21 (d, 1H, 2.3 Hz, arom. H), 7.35-7.40 (m, 2H, arom. H), 7.60 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 8.46 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.20 (s, 1H, NH), 11.54 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 31.8 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 99.6, 112.7, 113.6, 122.3, 129.3, 144.2 (tert. arom. C-Atome), 108.7, 126.6, 131.9, 132.7, 133.0, 140.6, 153.5 (quart. arom. C-Atome), 171.2 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) [279.30] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 279.10077, gefunden: 279.10010; Reinheit: 98.7%/97.8% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.25 min, ACN/Wasser: 35/65, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.02 min, AUC = 100%-Methode).

9-Methyl-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (2j)

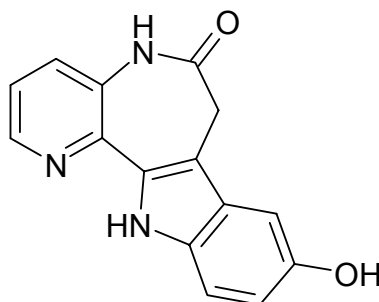


Eine Gemisch aus 176 mg (1.00 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 174 mg (1.10 mmol) 4-Methylphenylhydrazin-Hydrochlorid **44j** und 174 mg (1.10 mmol) Natriumacetat werden in 10 ml Eisessig für 30 Minuten bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf 5-prozentige Natriumacetat-Lösung (120 ml) gegossen. Ein sich bildender Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und in 70 ml Ethanol für 6 Stunden refluxiert. Beim Abkühlen fallen 135 mg (51%) eines farblosen Pulvers aus, welches abgesaugt wird.



Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3188 cm<sup>-1</sup> (NH), 3057 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2973 cm<sup>-1</sup> / 2912 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1673 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.61 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.02 (dd, 1H, 8.4/1.3 Hz, arom. H.), 7.35-7.40 (m, 2H, arom. H), 7.47 (d, 1H, 0.5 Hz, arom. H), 7.60 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 8.46 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.18 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 21.1 (CH<sub>3</sub>), 31.9 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 111.6, 117.8, 122.3, 124.6, 129.3, 144.2 (tert. arom. C-Atome), 108.4, 126.5, 127.6, 131.9, 132.5, 135.9, 140.6 (quart. arom. C-Atome) 171.0 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O) EI/HRMS [263.30] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 263.10587, gefunden: 263.10478; Reinheit: 98.0%/95.1% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.91 min, ACN/Wasser: 30/70, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Hydroxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-on (2k)

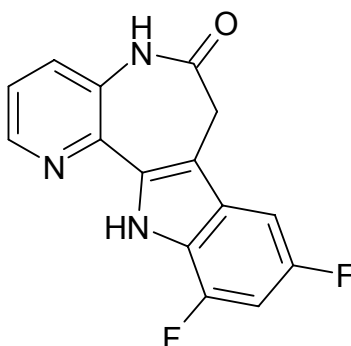


71 mg (0.25 mmol) 9-Methoxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-on (**2i**) werden in 10 ml trockenem Dichlormethan und mit 256 mg (1.0 mmol) Bortribromid bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung (2 Stunden) gerührt. Daraufhin wird der Ansatz mit 10 ml Wasser versetzt und eine weitere Stunde gerührt. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 34 mg (50 %) eines gelben Pulvers.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3189 cm<sup>-1</sup> (NH), 3064 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2981/2923 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1671 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.53 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 6.73 (dd, 1H, 8.7/2.2 Hz, arom. H), 6.93 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 7.27 (d, 1H, 8.7 Hz, arom. H), 7.37 (dd, 1H, 8.1/4.5 Hz, arom. H), 7.59 (dd, 1H, 8.2/1.2 Hz, arom. H), 8.45 (dd, 1H, 4.4/1.2 Hz, arom. H) 8.80 (br s, 1H, OH), 10.16 (s, 1H,

NH), 11.37 (s, 1H, NH),  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 32.0 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 101.7, 112.5, 114.1, 122.5, 130.2, 143.3 (tert. arom. C-Atome), 108.9, 126.9, 131.7, 132.2, 132.4, 139.9, 151.0 (quart. arom. C-Atome), 171.1 (C=O); EI/HRMS ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ ) EI/HRMS [265.27] ( $m/z$ ) [ $\text{M}^+$ ] berechnet: 265.08511, gefunden: 265.08405; Reinheit: 97.5%/96.8% (HPLC,  $t_s$  = 3.88 min, ACN/Wasser: 10/90, Säulenofentemperatur 25 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9,11-Difluor-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (2l)

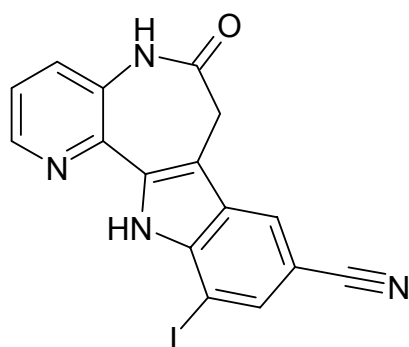


Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 151 mg (0.50 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(2,4-difluorphenyl)hydrazon] (**45l**). Der entstehende graue Niederschlag wird in DMSO aufgenommen und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Eluent: ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ : 40/60. Die Fraktion mit der enthaltenen Verbindung **2k** wird im Vakuum eingeeengt, dabei fallen 56 mg (39 %) eines farblosen Niederschlags aus, der abgesaugt wird.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3199  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3071  $\text{cm}^{-1}$  (CH-arom.), 2980  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1683  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.66 (s, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 7.06 (ddd, 1H, 11.1/9.6/2.0 Hz, arom. H), 7.45 (dd, 1H, 8.4/4.6 Hz, arom. H), 7.49 (dd, 1H, 9.4/2.0 Hz, arom. H), 7.64 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 8.51 (dd, 4.5/1.5 Hz, arom. H), 10.26 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 31.6 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 98.0 (dd, C10, 31/20 Hz), 99.5 (dd, C8, 23/4 Hz), 123.1 (C3), 129.6 (C4), 144.4 (C2) tert. arom. C-Atome, 110.3 (dd, C7a, 5/3 Hz), 122.2 (dd, C11a, 19/6 Hz), 128.8 (dd, C7b, 12/7 Hz), 132.6 (C4a),

139.9 (C12b), 148.3 (dd, C11, 247/13 Hz), 155.9 (dd, C9, 234/10 Hz) quart. arom. C-Atome, 171.1 (C=O), EI/HRMS ( $C_{15}H_9F_2N_3O$ ) [285.26] (m/z) [ $M^+$ ] berechnet: 285.07135, gefunden: 285.07083; Reinheit: 94.7%/94.8% (HPLC,  $t_s$  = 4.40 min, ACN/Wasser: 10/90, Säulenofentemperatur 40 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

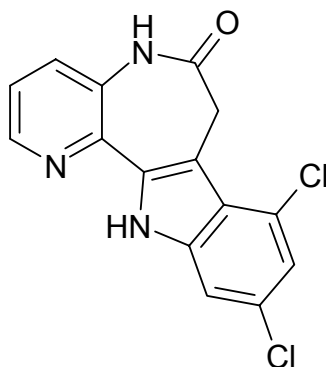
11-Iod-6-oxo-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-9(5*H*)-carbonitril (**2m**)



Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 50 mg (0.12 mmol) 3-Iod-4-[2-(6-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril (**45m**). Nach Umkristallisation erhält man 15 mg (31 %) eines grauen Pulvers.

Schmp.: >330°C; IR (KBr): 3202  $cm^{-1}$  (NH), 3067  $cm^{-1}$  (CH-arom.), 2969/2920  $cm^{-1}$  (CH-aliph.), 2224  $cm^{-1}$  (C≡N), 1675  $cm^{-1}$  (C=O);  $^1H$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.71 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.50 (dd, 1H, 8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.66 (dd, 1H, 8.3/1.4 Hz, arom. H), 7.99 (d, 1H, 1.4 Hz, arom. H), 8.47 (d, 1H, 1.1 Hz, arom. H), 8.56 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.34 (s, 1H, NH), 11.78 (s, 1H, NH);  $^{13}C$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 31.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 123.5, 124.5, 129.6, 133.7, 144.5 (tert. arom. C-Atome), 77.7, 103.3, 111.7, 118.9, 125.9, 133.0, 135.7, 139.4, 141.0 (quart. arom. C-Atome), 171.0 (C=O); EI/HRMS ( $C_{16}H_9IN_4O$ ) [400.17] (m/z) [ $M^+$ ] berechnet: 399.98212, gefunden: 399.98134; Reinheit: 92.0%/93.6% (HPLC,  $t_s$  = 3.71 min, ACN/Wasser: 40/60, Säulenofentemperatur 40 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

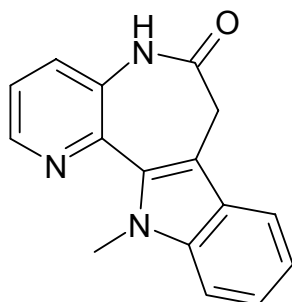
8,10-Dichlor-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2n**)



Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 159 mg (0.47 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(3,5-dichlorphenyl)hydrazon] (**45n**). Nach Umkristallisation erhält man 60 mg (40 %) eines feinen, weißen Pulvers.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3186 cm<sup>-1</sup> (NH), 3083 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2971 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1666 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.96 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.19 (d, 1H, 1.8 Hz, arom. H), 7.46-7.50 (m, 2H, arom. H), 7.64 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 8.52 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.35 (s, 1H, NH), 12.78 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 110.9, 120.1, 123.4, 129.5, 144.5 (tert. arom. C-Atome), 108.1, 121.3, 125.3, 126.8, 132.7, 135.4, 138.6, 139.3 (quart. arom. C-Atome), 170.8 (C=O); EI/HRMS (C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O) [318.16] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 317.0122, gefunden: 317.0113; Reinheit: 99.1%/99.5% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.69 min, ACN/Wasser: 40/60, Säulenofentemperatur 25 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

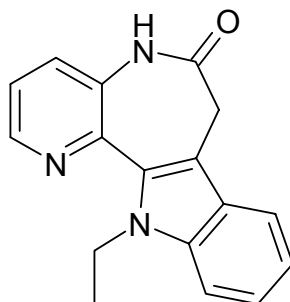
12-Methyl-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2o**)



Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 176 mg (1.0 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) und 134 mg (1.1 mmol) 1-Methyl-1-phenylhydrazin (**44o**). Man erhält 177 mg (67%) einer farblosen, amorphen Substanz.

Smp.: >330 °C (Dunkelfärbung ab 308 °C), IR (KBr): 3191 cm<sup>-1</sup> (NH), 3058 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2925 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1677 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.53 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 4.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.15 („dt“, 1H, 7.8/7.8/0.7 Hz, arom. H), 7.31 („dt“, 1H, 8.2/7.0/1.1 Hz, arom. H), 7.45 (dd, 1H, 8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.57 (d, 1H, 8.3 Hz, arom. H), 7.67 (dd, 1H, 8.2/1.5 Hz, arom. H), 7.76 (d, 1H, 7.9 Hz, arom. H), 8.56 (dd, 1H, 4.5/1.5 Hz, arom. H), 10.19 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>3</sub>), 110.2, 118.5, 119.5, 122.4, 123.1, 130.2, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 111.7, 125.0, 132.3, 133.2, 139.0, 141.2 (quart. arom. C-Atome), 172.1 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O) [263.30] berechnet: C 72.99, H 4.98, N 15.96, gefunden: C 72.74, H 4.96, N 15.56; Reinheit: 99.7%/99.7% (HPLC, t<sub>s</sub> = 4.16 min, ACN/Wasser: 20/80, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.02 min, AUC = 100%-Methode).

12-Ethyl-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2p**)

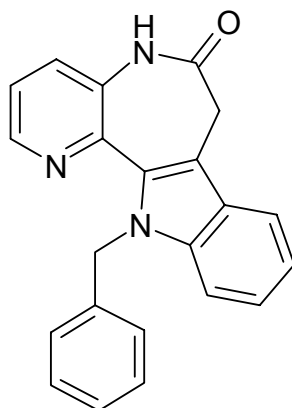


Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 88 mg (0.5 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) und 75 mg (0.55 mmol) 1-Ethyl-1-phenylhydrazin (**44p**). Man erhält 86 mg (62%) einer beigen, amorphen Substanz.

Schmp.: 276 °C, IR (KBr): 3189 cm<sup>-1</sup> (NH), 3060 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2961 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1673 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.26 (t, 3H, 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.52 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 4.63 (q, 2H, 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.15 („dt“, 1H, 7.9/7.1/0.8 Hz, arom. H), 7.29 („dt“, 1H, 8.2/7.0/1.1 Hz, arom. H), 7.44 (dd, 1H,

8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.59 (d, 1H, 8.3 Hz, arom. H), 7.68 (dd, 1H, 8.2/1.5 Hz, arom. H), 7.75 (d, 1H, 7.9 Hz, arom. H), 8.55 (dd, 1H, 4.5/1.5 Hz, arom. H), 10.17 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 15.3 ( $\text{CH}_3$ ), 31.5 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 38.8 ( $\text{CH}_2$ ), 110.2, 118.6, 119.5, 122.4, 123.1, 130.2, 144.4 (tert. arom. C-Atome), 111.8, 125.2, 131.5, 133.0, 137.8, 141.3 (quart. arom. C-Atome), 172.1 ( $\text{C}=\text{O}$ ); EI/HRMS ( $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ ) [277.33] ( $m/z$ ) [ $\text{M}^+$ ] berechnet: 277.12149, gefunden: 277.12057; Reinheit: 99.5%/99.4% (HPLC,  $t_s$  = 4.93 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.55: 45/55 Säulenofentemperatur 40 °C,  $t_m(\text{DMSO})$  = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

12-Benzyl-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2q**)

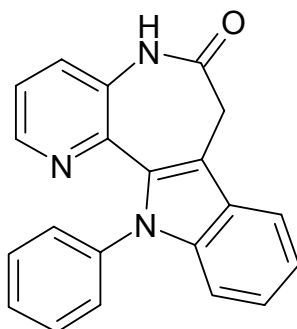


Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 88 mg (0.5 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 129 mg (0.55 mmol) 1-Benzyl-1-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**44q**) und 45 mg (0.55 mmol) Natriumacetat. Man erhält 49 mg (29%) an schwarzen Kristallen.

Schmp.: 276 – 278 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3191  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3052  $\text{cm}^{-1}$  (CH-arom.), 2971  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1664  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ );  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.57 (s, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 5.99 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.91 – 6.93 (m, 2H, arom. H), 7.11 – 7.18 (m, 4H, arom. H), 7.24 ("dt", 1H, 8.1/7.0/1.0 Hz, arom. H), 7.42 (dd, 1H, 8.2/4.5 Hz, arom. H), 7.53 (d, 1H, 8.3 Hz, arom. H), 7.65 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 7.78 (d, 1H, 7.9 Hz, arom. H), 8.51 (dd, 1H, 4.5/1.5 Hz, arom. H), 10.17 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 31.5 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 46.8 ( $\text{CH}_2$ ), 110.9, 118.6, 119.8, 122.6, 123.4, 126.3 (2C), 126.9, 128.3 (2C), 130.3, 144.3 (tert.

arom. C-Atome), 112.5, 125.4, 131.8, 133.1, 138.6, 138.8, 141.2 (quart. arom. C-Atome), 172.2 (C=O); EI/HRMS ( $C_{22}H_{17}N_3O$ ) [339.40] ( $m/z$ ) [ $M^+$ ] berechnet: 339.13715, gefunden: 339.13562; Reinheit: 94.9%/95.2% (HPLC,  $t_s$  = 5.34 min, ACN/Wasser: 40/60 Säulenofentemperatur 40 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

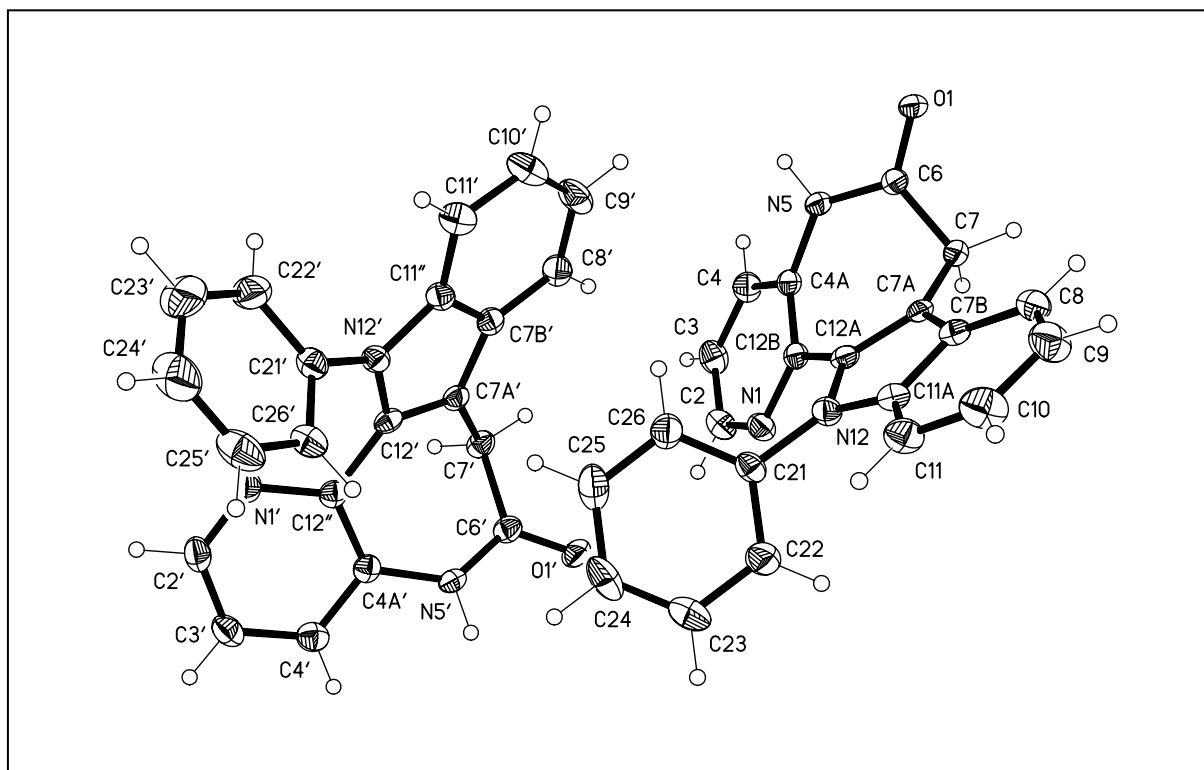
12-Phenyl-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**2r**)



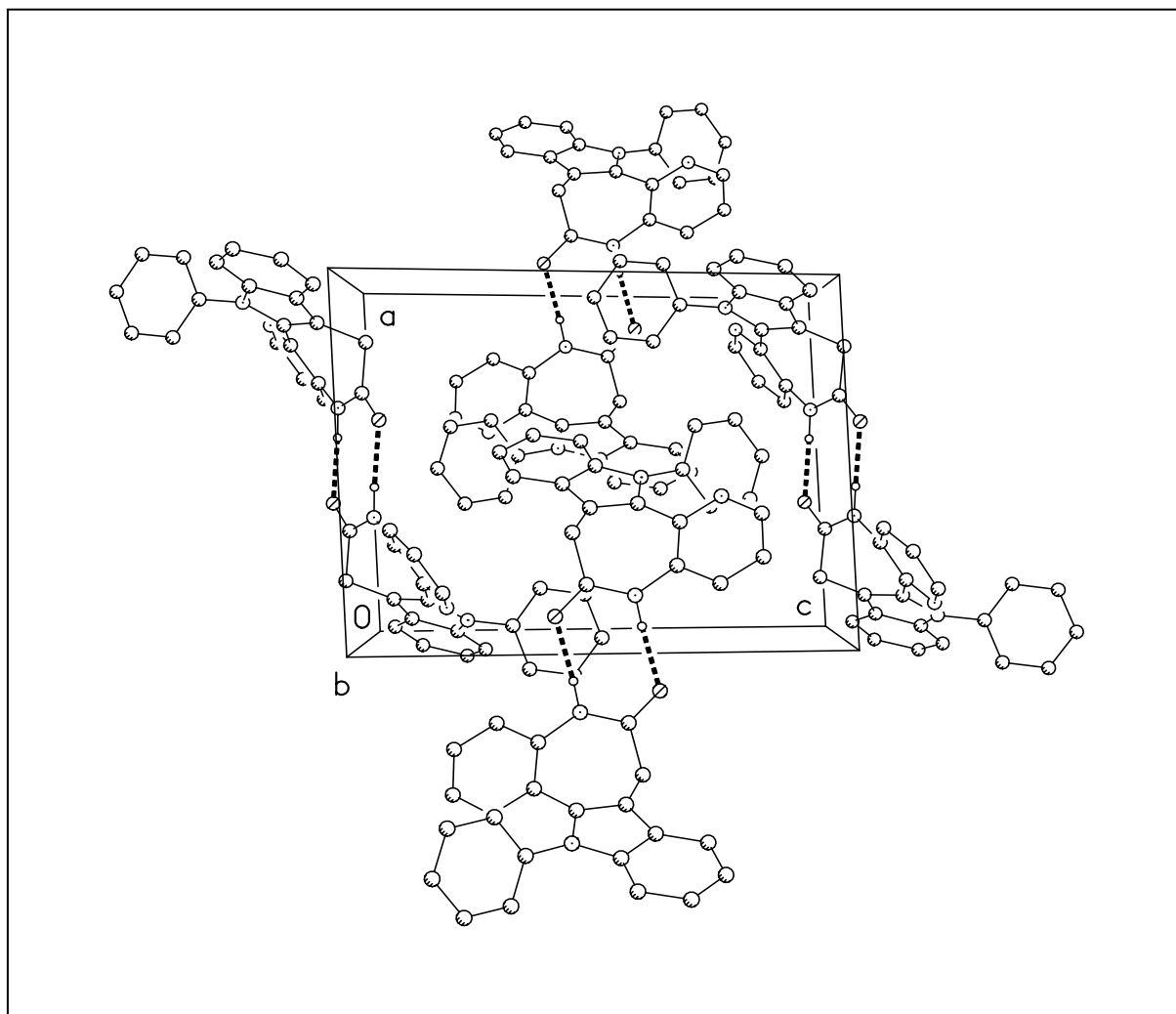
Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 88 mg (0.5 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 121 mg (0.55 mmol) 1,1-Diphenylhydrazin-Hydrochlorid (**44q**) und 45 mg (0.55 mmol) Natriumacetat. Man erhält 35 mg (20%) an braunen Kristallen.

Schmp.: 276 – 278 °C; IR (KBr): 3189  $cm^{-1}$  (NH), 3054  $cm^{-1}$  (CH-arom.), 2964/2921  $cm^{-1}$  (CH-aliph.), 1678  $cm^{-1}$  (C=O);  $^1H$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.64 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.19 – 7.29 (m, 6H, arom. H), 7.35 – 7.38 (m, 1H, arom. H), 7.43 – 7.46 (m, 2H, arom. H), 7.63 (dd, 1H, 8.2/1.5 Hz, arom. H), 7.86 (dd, 1H, 7.5/1.3 Hz, arom. H), 8.08 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.27 (s, 1H, NH);  $^{13}C$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 31.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 110.6, 118.8, 120.6, 122.2, 124.0, 126.8, 127.1 (2C), 129.0 (2C), 129.8, 144.0 (tert. arom. C-Atome), 114.0, 125.7, 132.8, 133.3, 138.6, 139.3, 140.5 (quart. arom. C-Atome), 172.2 (C=O); ( $C_{21}H_{15}N_3O$ ) [325.37] berechnet: C 77.52, H 4.65, N 12.91, gefunden: C 77.23, H 4.61, N 12.73; Reinheit: 99.7%/99.4% (HPLC,  $t_s$  = 8.17 min, ACN/Wasser: 40/60 Säulenofentemperatur 40 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

Abbildung 11-1: Röntgenkristallstrukturen von **2r<sup>a</sup>**







<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

## Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel:	$C_{21}H_{15}N_3O$	
$M_r$ :	325.36	
Temperatur:	133(2) K	
Wellenlänge:	0.71073 Å	
Kristallsystem:	Triklin	
Raumgruppe:	$P(-1)$	
Gitterkonstanten:	$a = 10.7025(14)$ Å	$\alpha = 100.946(3)^\circ$
	$b = 11.2676(15)$ Å	$\beta = 92.553(3)^\circ$
	$c = 14.0997(18)$ Å	$\gamma = 91.217(3)^\circ$
Volumen:	1666.9(4) Å <sup>3</sup>	
Z:	4	
Dichte (berechnet):	1.296 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorptionskoeffizient:	0.082 mm <sup>-1</sup>	
F(000):	680	
Kristallgröße:	0.45 x 0.20 x 0.17 mm <sup>3</sup>	
$\theta$ -Bereich für Datensammlung:	1.47 bis 28.28°	
Limitierte Indices:	$-14 \leq h \leq 14$ , $-15 \leq k \leq 15$ , $-18 \leq l \leq 18$	
Zahl der Reflexionen	20215	
Unabhängige Reflexionen	8163 [R(int) = 0.0605]	
Vollständigkeit bis $\theta = 28.28^\circ$	98.9 %	
Absorptionskorrektur	keine	
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on $F^2$	
Daten / Einschränkung / Parameter	8163 / 0 / 459	
Goodness-of-fit on $F^2$	1.048	
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0562, wR2 = 0.1074	
R indices (alle Daten)	R1 = 0.0903, wR2 = 0.1156	
Größte Differenzpeaks	0.266 und -0.242 e.Å <sup>-3</sup>	

Tabelle 11-1: Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$  Tensors.<sup>a,b</sup>

	x	y	z	U(eq)
O(1)	3847.4(10)	3957.9(10)	-577.0(8)	21.8(3)
N(1)	1104.5(13)	7520.2(13)	1824.3(9)	22.7(3)
C(2)	1548.5(17)	8627.8(16)	1807.8(12)	26.0(4)
C(3)	2580.5(17)	8859.1(16)	1307.9(12)	27.8(4)
C(4)	3189.2(16)	7892.4(16)	803.5(12)	25.0(4)
C(4A)	2765.6(14)	6722.7(15)	814.5(11)	18.8(3)
N(5)	3487.2(13)	5756.0(13)	362.9(9)	19.8(3)
C(6)	3095.5(14)	4699.6(15)	-212.3(11)	18.1(3)
C(7)	1701.3(14)	4480.1(15)	-356.5(11)	18.8(3)
C(7A)	1181.8(14)	4394.3(14)	600.2(11)	17.2(3)
C(7B)	574.3(14)	3401.0(15)	899.0(11)	19.5(4)
C(8)	271.3(16)	2196.6(16)	467.1(13)	26.6(4)
C(9)	-316.3(18)	1466.2(17)	996.8(14)	35.4(5)
C(10)	-608.6(18)	1898.2(17)	1958.3(14)	36.1(5)
C(11)	-345.1(16)	3081.5(16)	2399.5(13)	28.4(4)
C(11A)	234.2(15)	3824.2(15)	1861.1(12)	21.0(4)
N(12)	608.1(12)	5030.6(12)	2125.5(9)	20.4(3)
C(12A)	1206.1(14)	5364.4(15)	1353.1(11)	18.6(3)
C(12B)	1703.1(14)	6569.2(15)	1337.8(11)	18.4(3)
C(21)	492.1(15)	5734.1(15)	3074.8(11)	20.9(4)
C(22)	-690.9(17)	6037.9(17)	3381.2(13)	29.2(4)
C(23)	-815.1(19)	6704.9(18)	4298.5(13)	36.3(5)
C(24)	221(2)	7071.2(18)	4898.7(13)	36.6(5)
C(25)	1392.6(19)	6752.9(18)	4593.5(13)	37.4(5)
C(26)	1534.8(17)	6075.3(17)	3679.9(12)	28.5(4)
N(1')	4109.1(12)	9957.1(13)	7402.0(10)	22.0(3)
O(1')	979.4(10)	9917.6(12)	4013.6(8)	30.0(3)
C(2')	3666.4(16)	10685.4(16)	8153.5(12)	26.6(4)
C(3')	2552.5(17)	11281.6(16)	8114.1(12)	27.6(4)
C(4')	1870.7(16)	11128.6(15)	7251.5(12)	24.3(4)
C(4A')	2307.7(14)	10369.3(14)	6442.8(11)	19.1(3)
N(5')	1526.6(13)	10155.6(13)	5594.2(10)	22.0(3)
C(6')	1811.0(15)	10027.1(15)	4656.8(12)	21.2(4)

C(7')	3170.4(14)	10020.7(16)	4433.0(12)	21.7(4)
C(7A')	3797.6(14)	9008.3(15)	4794.5(11)	18.7(3)
C(7B')	4420.5(14)	8007.5(15)	4264.0(11)	19.8(3)
C(8')	4616.0(15)	7610.2(16)	3280.1(12)	24.3(4)
C(9')	5278.0(17)	6588.5(17)	3006.5(13)	31.7(4)
C(10')	5750.8(18)	5941.2(17)	3691.1(13)	32.6(4)
C(11')	5577.0(16)	6303.0(16)	4666.6(12)	26.2(4)
C(11'')	4909.7(15)	7348.3(15)	4943.8(11)	20.0(4)
N(12')	4594.8(12)	7923.7(12)	5855.1(9)	19.1(3)
C(12')	3905.8(14)	8934.0(14)	5750.9(11)	18.0(3)
C(12'')	3435.8(14)	9779.7(14)	6554.9(11)	18.8(3)
C(21')	4805.4(16)	7469.6(15)	6720.8(12)	22.4(4)
C(22')	6006.5(18)	7259.5(19)	7029.7(13)	36.8(5)
C(23')	6182(2)	6822(2)	7880.6(15)	52.6(6)
C(24')	5176(2)	6624(2)	8412.0(15)	51.3(6)
C(25')	3990(2)	6840.2(18)	8106.2(14)	38.6(5)
C(26')	3795.4(17)	7246.3(15)	7251.9(12)	25.8(4)

---

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup>Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 11-2: Bindungslängen [Å] und -winkel [°]<sup>a,b</sup>

O(1)-C(6)	1.2299(18)	N(1')-C(2')	1.324(2)
N(1)-C(2)	1.331(2)	N(1')-C(12'')	1.346(2)
N(1)-C(12B)	1.349(2)	O(1')-C(6')	1.2291(19)
C(2)-C(3)	1.383(2)	C(2')-C(3')	1.385(2)
C(3)-C(4)	1.376(2)	C(3')-C(4')	1.370(2)
C(4)-C(4A)	1.388(2)	C(4')-C(4A')	1.395(2)
C(4A)-C(12B)	1.408(2)	C(4A')-C(12'')	1.407(2)
C(4A)-N(5)	1.416(2)	C(4A')-N(5')	1.408(2)
N(5)-C(6)	1.354(2)	N(5')-C(6')	1.351(2)
C(6)-C(7)	1.506(2)	C(6')-C(7')	1.502(2)
C(7)-C(7A)	1.501(2)	C(7')-C(7A')	1.495(2)
C(7A)-C(12A)	1.370(2)	C(7A')-C(12')	1.367(2)
C(7A)-C(7B)	1.423(2)	C(7A')-C(7B')	1.425(2)
C(7B)-C(8)	1.403(2)	C(7B')-C(8')	1.401(2)
C(7B)-C(11A)	1.416(2)	C(7B')-C(11'')	1.409(2)
C(8)-C(9)	1.373(2)	C(8')-C(9')	1.366(2)
C(9)-C(10)	1.402(3)	C(9')-C(10')	1.400(3)
C(10)-C(11)	1.378(3)	C(10')-C(11')	1.380(2)
C(11)-C(11A)	1.386(2)	C(11')-C(11'')	1.391(2)
C(11A)-N(12)	1.385(2)	C(11'')-N(12')	1.3844(19)
N(12)-C(12A)	1.3944(19)	N(12')-C(12')	1.3967(19)
N(12)-C(21)	1.432(2)	N(12')-C(21')	1.421(2)
C(12A)-C(12B)	1.452(2)	C(12')-C(12'')	1.452(2)
C(21)-C(26)	1.376(2)	C(21')-C(22')	1.379(2)
C(21)-C(22)	1.385(2)	C(21')-C(26')	1.387(2)
C(22)-C(23)	1.380(2)	C(22')-C(23')	1.388(3)
C(23)-C(24)	1.371(3)	C(23')-C(24')	1.378(3)
C(24)-C(25)	1.376(3)	C(24')-C(25')	1.363(3)
C(25)-C(26)	1.384(2)	C(25')-C(26')	1.377(2)
C(2)-N(1)-C(12B)	118.28(14)	O(1)-C(6)-N(5)	121.18(15)
N(1)-C(2)-C(3)	123.63(16)	O(1)-C(6)-C(7)	122.50(15)
C(4)-C(3)-C(2)	118.35(17)	N(5)-C(6)-C(7)	116.30(14)
C(3)-C(4)-C(4A)	119.74(15)	C(7A)-C(7)-C(6)	108.51(12)
C(4)-C(4A)-C(12B)	118.17(15)	C(12A)-C(7A)-C(7B)	108.19(13)
C(4)-C(4A)-N(5)	117.83(14)	C(12A)-C(7A)-C(7)	121.97(14)
C(12B)-C(4A)-N(5)	123.81(15)	C(7B)-C(7A)-C(7)	129.81(14)
C(6)-N(5)-C(4A)	128.90(14)	C(8)-C(7B)-C(11A)	118.50(15)

C(8)-C(7B)-C(7A)	135.11(15)	O(1')-C(6')-N(5')	120.69(15)
C(11A)-C(7B)-C(7A)	106.39(14)	O(1')-C(6')-C(7')	121.57(15)
C(9)-C(8)-C(7B)	118.99(16)	N(5')-C(6')-C(7')	117.74(14)
C(8)-C(9)-C(10)	121.34(18)	C(7A')-C(7')-C(6')	110.01(13)
C(11)-C(10)-C(9)	121.21(17)	C(12')-C(7A')-C(7B')	107.70(14)
C(10)-C(11)-C(11A)	117.49(16)	C(12')-C(7A')-C(7')	123.30(14)
N(12)-C(11A)-C(11)	129.36(15)	C(7B')-C(7A')-C(7')	128.95(14)
N(12)-C(11A)-C(7B)	108.20(13)	C(8')-C(7B')-C(11'')	119.42(15)
C(11)-C(11A)-C(7B)	122.43(16)	C(8')-C(7B')-C(7A')	133.75(16)
C(11A)-N(12)-C(12A)	108.19(13)	C(11'')-C(7B')-C(7A')	106.83(13)
C(11A)-N(12)-C(21)	123.68(13)	C(9')-C(8')-C(7B')	118.80(16)
C(12A)-N(12)-C(21)	127.82(14)	C(8')-C(9')-C(10')	121.00(16)
C(7A)-C(12A)-N(12)	109.00(14)	C(11')-C(10')-C(9')	121.92(17)
C(7A)-C(12A)-C(12B)	125.93(14)	C(10')-C(11')-C(11'')	116.95(16)
N(12)-C(12A)-C(12B)	124.98(14)	N(12')-C(11'')-C(11')	129.92(15)
N(1)-C(12B)-C(4A)	121.82(15)	N(12')-C(11'')-C(7B')	108.17(13)
N(1)-C(12B)-C(12A)	117.90(14)	C(11')-C(11'')-C(7B')	121.90(14)
C(4A)-C(12B)-C(12A)	120.27(14)	C(11'')-N(12')-C(12')	107.97(13)
C(26)-C(21)-C(22)	120.63(16)	C(11'')-N(12')-C(21')	125.19(13)
C(26)-C(21)-N(12)	120.57(14)	C(12')-N(12')-C(21')	126.40(13)
C(22)-C(21)-N(12)	118.78(15)	C(7A')-C(12')-N(12')	109.32(13)
C(23)-C(22)-C(21)	119.29(18)	C(7A')-C(12')-C(12'')	126.70(14)
C(24)-C(23)-C(22)	120.46(18)	N(12')-C(12')-C(12'')	123.93(14)
C(23)-C(24)-C(25)	119.90(17)	N(1')-C(12'')-C(4A')	122.08(14)
C(24)-C(25)-C(26)	120.46(19)	N(1')-C(12'')-C(12')	117.45(14)
C(21)-C(26)-C(25)	119.23(17)	C(4A')-C(12'')-C(12')	120.46(14)
C(2')-N(1')-C(12'')	118.22(14)	C(22')-C(21')-C(26')	120.47(16)
N(1')-C(2')-C(3')	123.57(16)	C(22')-C(21')-N(12')	120.03(15)
C(4')-C(3')-C(2')	118.81(16)	C(26')-C(21')-N(12')	119.50(15)
C(3')-C(4')-C(4A')	119.29(16)	C(21')-C(22')-C(23')	118.66(18)
C(4')-C(4A')-C(12'')	118.00(15)	C(24')-C(23')-C(22')	120.45(19)
C(4')-C(4A')-N(5')	117.37(14)	C(25')-C(24')-C(23')	120.63(19)
C(12'')-C(4A')-N(5')	124.34(14)	C(24')-C(25')-C(26')	119.72(18)
C(6')-N(5')-C(4A')	130.48(14)	C(25')-C(26')-C(21')	120.03(18)

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup>Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 11-3: Torsionswinkel [°]

C(12B)-N(1)-C(2)-C(3)	0.9(3)	C(11A)-N(12)-C(12A)-C(7A)	1.62(17)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.4(3)	C(21)-N(12)-C(12A)-C(7A)	175.46(15)
C(2)-C(3)-C(4)-C(4A)	-0.5(3)	C(11A)-N(12)-C(12A)-C(12B)	
C(3)-C(4)-C(4A)-C(12B)	0.9(2)		178.22(14)
C(3)-C(4)-C(4A)-N(5)	-174.15(16)	C(21)-N(12)-C(12A)-C(12B)	-7.9(2)
C(4)-C(4A)-N(5)-C(6)	-137.74(17)	C(2)-N(1)-C(12B)-C(4A)	-0.5(2)
C(12B)-C(4A)-N(5)-C(6)	47.5(2)	C(2)-N(1)-C(12B)-C(12A)	-179.50(15)
C(4A)-N(5)-C(6)-O(1)	177.78(14)	C(4)-C(4A)-C(12B)-N(1)	-0.4(2)
C(4A)-N(5)-C(6)-C(7)	-3.6(2)	N(5)-C(4A)-C(12B)-N(1)	174.36(14)
O(1)-C(6)-C(7)-C(7A)	114.41(16)	C(4)-C(4A)-C(12B)-C(12A)	178.56(15)
N(5)-C(6)-C(7)-C(7A)	-64.21(18)	N(5)-C(4A)-C(12B)-C(12A)	-6.7(2)
C(6)-C(7)-C(7A)-C(12A)	66.03(18)	C(7A)-C(12A)-C(12B)-N(1)	143.33(16)
C(6)-C(7)-C(7A)-C(7B)	-116.06(17)	N(12)-C(12A)-C(12B)-N(1)	-32.7(2)
C(12A)-C(7A)-C(7B)-C(8)	-179.94(18)	C(7A)-C(12A)-C(12B)-C(4A)	-35.7(2)
C(7)-C(7A)-C(7B)-C(8)	1.9(3)	N(12)-C(12A)-C(12B)-C(4A)	148.31(15)
C(12A)-C(7A)-C(7B)-C(11A)	0.22(17)	C(11A)-N(12)-C(21)-C(26)	108.49(19)
C(7)-C(7A)-C(7B)-C(11A)	-177.92(15)	C(12A)-N(12)-C(21)-C(26)	-64.5(2)
C(11A)-C(7B)-C(8)-C(9)	-1.4(2)	C(11A)-N(12)-C(21)-C(22)	-69.9(2)
C(7A)-C(7B)-C(8)-C(9)	178.73(17)	C(12A)-N(12)-C(21)-C(22)	117.16(18)
C(7B)-C(8)-C(9)-C(10)	-0.5(3)	C(26)-C(21)-C(22)-C(23)	1.0(3)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	1.7(3)	N(12)-C(21)-C(22)-C(23)	179.33(15)
C(9)-C(10)-C(11)-C(11A)	-0.8(3)	C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	0.5(3)
C(10)-C(11)-C(11A)-N(12)	-179.43(17)	C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-1.3(3)
C(10)-C(11)-C(11A)-C(7B)	-1.2(3)	C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	0.7(3)
C(8)-C(7B)-C(11A)-N(12)	-179.10(14)	C(22)-C(21)-C(26)-C(25)	-1.5(3)
C(7A)-C(7B)-C(11A)-N(12)	0.77(17)	N(12)-C(21)-C(26)-C(25)	-179.89(16)
C(8)-C(7B)-C(11A)-C(11)	2.3(2)	C(24)-C(25)-C(26)-C(21)	0.7(3)
C(7A)-C(7B)-C(11A)-C(11)	-177.80(15)	C(12'')-N(1')-C(2')-C(3')	-0.5(3)
C(11)-C(11A)-N(12)-C(12A)	176.98(16)	N(1')-C(2')-C(3')-C(4')	-0.9(3)
C(7B)-C(11A)-N(12)-C(12A)	-1.47(17)	C(2')-C(3')-C(4')-C(4A')	0.7(3)
C(11)-C(11A)-N(12)-C(21)	2.8(3)	C(3')-C(4')-C(4A')-C(12'')	0.6(2)
C(7B)-C(11A)-N(12)-C(21)	-175.62(14)	C(3')-C(4')-C(4A')-N(5')	174.62(15)
C(7B)-C(7A)-C(12A)-N(12)	-1.13(17)	C(4')-C(4A')-N(5')-C(6')	142.87(17)
C(7)-C(7A)-C(12A)-N(12)	177.19(13)	C(12'')-C(4A')-N(5')-C(6')	-43.6(3)
C(7B)-C(7A)-C(12A)-C(12B)	-	C(4A')-N(5')-C(6')-O(1')	-175.44(16)
	177.69(14)	C(4A')-N(5')-C(6')-C(7')	4.7(3)
C(7)-C(7A)-C(12A)-C(12B)	0.6(2)	O(1')-C(6')-C(7')-C(7A')	-120.51(17)

N(5')-C(6')-C(7')-C(7A')	59.4(2)	N(12')-C(12')-C(12'')-C(4A')	-148.03(15)
C(6')-C(7')-C(7A')-C(12')	-63.1(2)	C(11'')-N(12')-C(21')-C(22')	60.8(2)
C(6')-C(7')-C(7A')-C(7B')	119.80(18)	C(12')-N(12')-C(21')-C(22')	-127.80(18)
C(12')-C(7A')-C(7B')-C(8')	179.81(18)	C(11'')-N(12')-C(21')-C(26')	-119.56(18)
C(7')-C(7A')-C(7B')-C(8')	-2.8(3)	C(12')-N(12')-C(21')-C(26')	51.9(2)
C(12')-C(7A')-C(7B')-C(11'')	-0.57(18)	C(26')-C(21')-C(22')-C(23')	0.0(3)
C(7')-C(7A')-C(7B')-C(11'')	176.84(16)	N(12')-C(21')-C(22')-C(23')	179.64(18)
C(11'')-C(7B')-C(8')-C(9')	0.1(2)	C(21')-C(22')-C(23')-C(24')	-1.1(4)
C(7A')-C(7B')-C(8')-C(9')	179.65(18)	C(22')-C(23')-C(24')-C(25')	0.7(4)
C(7B')-C(8')-C(9')-C(10')	0.3(3)	C(23')-C(24')-C(25')-C(26')	0.9(4)
C(8')-C(9')-C(10')-C(11')	-0.3(3)	C(24')-C(25')-C(26')-C(21')	-2.0(3)
C(9')-C(10')-C(11')-C(11'')	-0.2(3)	C(22')-C(21')-C(26')-C(25')	1.6(3)
C(10')-C(11')-C(11'')-N(12')	-179.85(17)	N(12')-C(21')-C(26')-C(25')	-178.09(16)
C(10')-C(11')-C(11'')-C(7B')	0.6(3)		
C(8')-C(7B')-C(11'')-N(12')	179.81(14)		
C(7A')-C(7B')-C(11'')-N(12')	0.13(18)		
C(8')-C(7B')-C(11'')-C(11')	-0.5(2)		
C(7A')-C(7B')-C(11'')-C(11')	179.81(15)		
C(11')-C(11'')-N(12')-C(12')	-179.29(17)		
C(7B')-C(11'')-N(12')-C(12')	0.35(17)		
C(11')-C(11'')-N(12')-C(21')	-6.5(3)		
C(7B')-C(11'')-N(12')-C(21')	173.12(15)		
C(7B')-C(7A')-C(12')-N(12')	0.80(18)		
C(7')-C(7A')-C(12')-N(12')	-176.79(14)		
C(7B')-C(7A')-C(12')-C(12'')	178.49(15)		
C(7')-C(7A')-C(12')-C(12'')	0.9(3)		
C(11'')-N(12')-C(12')-C(7A')	-0.72(17)		
C(21')-N(12')-C(12')-C(7A')	-173.38(15)		
C(11'')-N(12')-C(12')-C(12'')	-178.49(14)		
C(21')-N(12')-C(12')-C(12'')	8.8(2)		
C(2')-N(1')-C(12'')-C(4A')	1.9(2)		
C(2')-N(1')-C(12'')-C(12')	-177.15(14)		
C(4')-C(4A')-C(12'')-N(1')	-2.0(2)		
N(5')-C(4A')-C(12'')-N(1')	-175.54(15)		
C(4')-C(4A')-C(12'')-C(12')	177.03(14)		
N(5')-C(4A')-C(12'')-C(12')	3.5(2)		
C(7A')-C(12')-C(12'')-N(1')	-146.33(16)		
N(12')-C(12')-C(12'')-N(1')	31.0(2)		
C(7A')-C(12')-C(12'')-C(4A')	34.6(2)		



Tabelle 11-4: Wasserstoffbrückenbindungen [ $\text{\AA}$  und  $^\circ$ ]<sup>a,b</sup>

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(5)-H(5)...O(1)#1	0.90(2)	1.96(2)	2.8600(18)	172.8(18)
N(5')-H(5')...O(1')#2	0.89(2)	1.88(2)	2.7652(18)	174.5(18)
C(9')-H(9')...O(1)#1	0.95	2.61	3.535(2)	165.9
C(24')-H(24')...O(1)#3	0.95	2.45	3.368(2)	162.9
C(2)-H(2)...O(1')	0.95	2.59	3.263(2)	128.2

Es wurden Symmetrietransformationen benutzt um äquivalente Atome zu generieren.

#1 -x+1,-y+1,-z

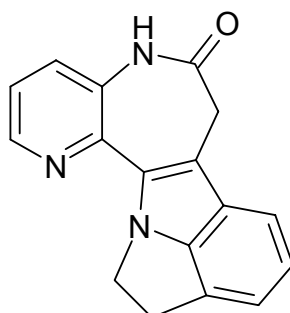
#2 -x,-y+2,-z+1

#3 -x+1,-y+1,-z+1

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup>Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

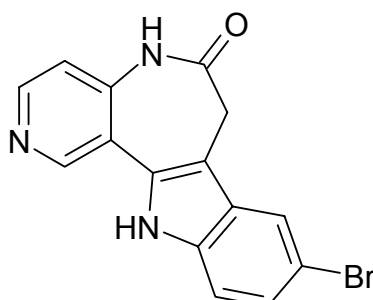
5,7,11,12-Tetrahydro-6*H*-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]pyrrolo[3,2,1-*h*]indol-6-on  
(2s)



Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 88 mg (0.5 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 85 mg (0.55 mmol) Indolin-1-amin-Hydrochlorid (**44s**) und 45 mg (0.55 mmol) Natriumacetat. Man erhält 65 mg (47%) an farblosen Kristallen.

Schmp.: >330 °C (Dunkelfärbung ab 295 °C); IR (KBr): 3188 cm<sup>-1</sup> (NH), 3046 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2963 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1672 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.60 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.76 (t, 2H, 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.76 (t, 2H, 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.97 – 7.00 (m, 2H, arom. H), 7.37 – 7.40 (m, 2H, arom. H), 7.61 (dd, 1H, 8.2/1.4 Hz, arom. H), 8.49 (dd, 1H, 4.5/1.4 Hz, arom. H), 10.23 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 33.0, 33.2, 50.8 (CH<sub>2</sub>), 116.0, 116.4, 121.8, 122.2, 129.5, 144.6 (tert. arom. C-Atome), 112.3, 117.8, 125.5, 132.0, 132.3, 140.8, 148.9 (quart. arom. C-Atome), 171.1 (C=O); EI/HRMS (C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O) [275.31] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 275.10587, gefunden: 275.10476; Reinheit: 94.2%/94.1% (HPLC, t<sub>s</sub> = 5.08 min, ACN/Wasser: 40/60 Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Brom-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (3a)



## Methode A:

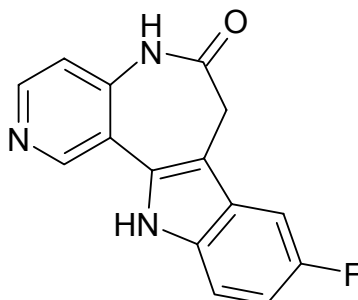
Die Synthese erfolgt nach AAV3 aus 54 mg (0.32 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**), 79 mg (0.35 mmol) (4-Bromphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44a**) und 29 mg (0.35 mmol) Natriumacetat. Nach Umkristallisation werden 23 mg (20 %) eines grauen Pulvers erhalten.

## Methode B:

Nach AAV4 erfolgt die Synthese aus 61 mg (0.18 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion-5-[(4-bromphenyl)hydrazon] (**52a**) unter Erhalt von 1 mg (1 %) eines braunen Pulvers. Die <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Daten entsprachen denen, die nach Methode A erhalten wurden.

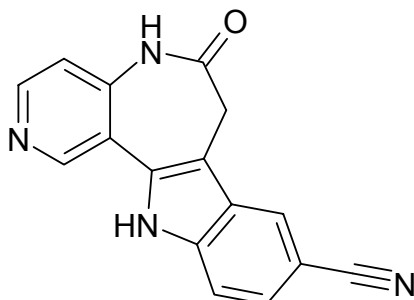
Schmp.: >330 °C, IR (KBr): 3167 cm<sup>-1</sup> (NH), 3085/3049 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2952/2849 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1680 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.66 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.19 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 7.31 (dd, 1H, 8.6/1.9 Hz, arom. H), 7.42 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.96 (d, 1H, 1.8 Hz, arom. H), 8.45 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 8.92 (s, 1H, arom. H), 10.53 (s, 1H, NH), 11.96 (s, 1H, NH); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO + TFA, 400 MHz): δ (ppm) = 3.92 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.41 (dd, 1H, 8.7/1.8 Hz, arom. H), 7.52 (d, 1H, 8.7 Hz, arom. H), 7.70 (d, 1H, 6.6 Hz, arom. H), 8.08 (d, 1H, 1.7 Hz, arom. H), 8.73 (d, 1H, 6.6 Hz, arom. H), 9.18 (s, 1H, arom. H), 11.60 (s, 1H, NH), 12.22 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO + TFA, 100,6 MHz): δ (ppm) = 32.4 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 114.2, 117.6, 121.6, 126.8, 139.4, 140.8 (tert. arom. C-Atome), 109.7, 112.9, 119.5, 128.4, 128.7, 137.3, 148.6 (quart. arom. C-Atome), 171.0 (C=O), EI/HRMS (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>3</sub>O) [328.17] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 327.00070, gefunden: 326.99897; Reinheit: 99.8%/99.7% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.15 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 60/40, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.04 min, AUC = 100%-Methode).

9-Fluor-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**3b**)



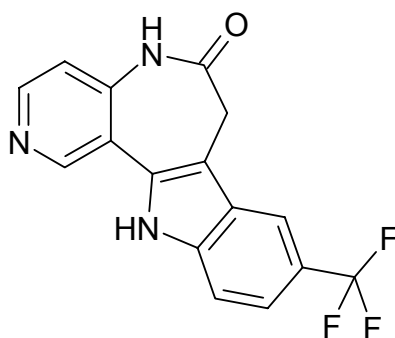
Die Synthese erfolgt nach AAV3 aus 120 mg (0.68 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**), 122 mg (0.75 mmol) (4-Fluorphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44b**) und 62 mg (0.75 mmol) Natriumacetat. Nach Umkristallisation werden 80 mg (44 %) eines grauen Pulvers erhalten.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3163 cm<sup>-1</sup> (NH), 3063 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2958 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1679 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.65 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.05 (ddd, 1H, 9.3/9.1/2.5 Hz, arom. H), 7.19 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 7.45 (dd, 1H, 8.8/4.5 Hz, arom. H), 7.54 (dd, 1H, 9.9/2.4 Hz, arom. H), 8.45 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 8.92 (s, 1H, arom. H), 10.54 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 103.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 24 Hz), 110.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 27 Hz), 112.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 10 Hz), 115.6, 148.2, 148.5 (tert. arom. C-Atome), 108.4 (d, <sup>4</sup>J<sub>C,F</sub> = 5 Hz), 117.9, 126.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 10 Hz), 131.8, 134.4, 141.7 (quart. arom. C-Atome), 171.3 (C=O); (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>3</sub>O) [267.26] ber.: C 67.41, H 3.77, N 15.72, gef.: C 67.73, H 3.77 N 15.41; Reinheit: 99.3%/98.6% (HPLC, t<sub>s</sub> = 4.41 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 70/30, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-9-carbonitril (**3c**)

Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 200 mg (0.69 mmol) 4-[2-(2-Oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-5-yliden)hydrazono]benzonitril (**52c**) unter Erhalt von 11 mg (6 %) eines schwarzen Pulvers.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3192 cm<sup>-1</sup> (NH), 3064 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2952 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 2212 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1679 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.74 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.21 (d, 1H, 5.5 Hz, arom.H), 7.55 (dd, 8.5/1.1 Hz, arom.H), 7.61 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 8.37 (s, 1H, arom. H), 8.48 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 8.94 (s, 1H, arom. H), 10.61 (s, 1H, NH), 12.36 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 112.8, 115.6, 117.2, 124.1, 125.1, 148.8 (tert. arom. C-Atome), 101.5, 108.9, 120.5, 126.3, 132.4, 139.2, 142.0, 148.3 (quart. arom. C-Atome), 171.1 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O) [274.28] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 274.08545, gefunden: 274.08512; Reinheit: 99.5%/98.9% (HPLC, t<sub>s</sub> = 4.78 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 20/80, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Trifluormethyl-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**3d**)

## Methode A:

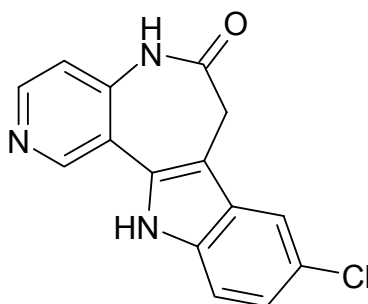
Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 78 mg (0.23 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion-5-[[4-trifluormethyl]phenyl]hydrazon} (**52d**) unter Erhalt von 4 mg (6 %) eines hellbraunen Pulvers. Die <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Daten entsprachen denen, die nach Methode B erhalten wurden.

## Methode B:

Die Synthese erfolgt nach AAV3 aus 140 mg (0.79 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) und 154 mg (0.87 mmol) [4-(Trifluormethyl)phenyl]hydrazin (**44d**). Nach Umkristallisation werden 18 mg (7 %) eines beigen Pulvers erhalten.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3193 cm<sup>-1</sup> (NH), 3049 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2961 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1679 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.76 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.22 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 7.50 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 7.65 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 8.19 (s, 1H, arom. H), 8.48 (d, 1H, 5.3 Hz, arom. H), 8.96 (s, 1H, arom. H), 10.61 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 112.3, 115.5, 116.1 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 4.2 Hz, C-C-CF<sub>3</sub>), 118.8 (q, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 3.6 Hz, C-C-CF<sub>3</sub>), 148.4, 148.8 (tert. arom. C-Atome), 109.1, 117.6, 120.6 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 31.6 Hz, C-CF<sub>3</sub>), 125.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 271 Hz, CF<sub>3</sub>), 125.9, 132.1, 139.1, 141.9 (quart. arom. C-Atome), 171.2 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O) [317.27] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 317.07758, gefunden: 317.07713; Reinheit: 99.0%/98.8% (HPLC, t<sub>s</sub> = 6.30 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 70/30, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

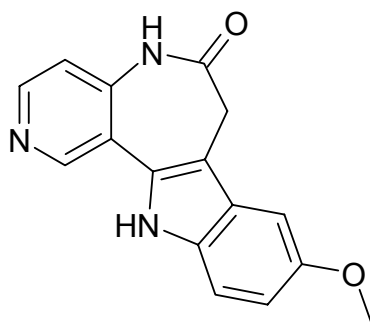
9-Chlor-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**3e**)



Die Synthese erfolgt nach AAV3 aus 102 mg (0.58 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**), 114 mg (0.63 mmol) (4-Chlorphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44e**) und 53 mg (0.63 mmol) Natriumacetat. Nach Umkristallisation werden 33 mg (20 %) eines grauen Pulvers erhalten.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3149 cm<sup>-1</sup> (NH), 3078/3051 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2951 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1681 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.66 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.18 – 7.21 (m, 2H, arom. H), 7.47 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 7.82 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 8.45 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 8.92 (s, 1H, arom. H), 10.53 (s, 1H, NH), 11.94 (s, 1H, NH); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.92 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.29 (dd, 1H, 8.7/2.0 Hz, arom. H), 7.56 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 7.69 (d, 1H, 6.6 Hz, arom. H), 7.93 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 8.72 (dd, 1H, 6.6/0.9 Hz, arom. H), 9.17 (s, 1H, arom. H), 11.59 (s, 1H, NH), 12.19 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO + TFA, 100,6 MHz): δ (ppm) = 32.3 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 113.7, 117.6, 118.5, 124.2, 139.3, 140.6 (tert. arom. C-Atome), 109.8, 119.4, 125.0, 127.6, 128.8, 137.0, 148.5 (quart. arom. C-Atome), 170.9 (C=O); EI/HRMS (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O) [283.72] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 283.05124, gefunden: 283.05063; Reinheit: 99.9%/99.8% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.35 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 80/20, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

#### 9-Methoxy-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(6*H*)-on (**3i**)

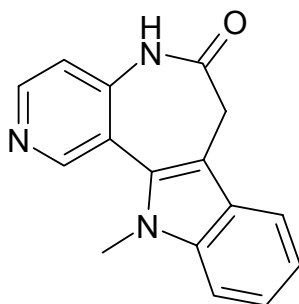


Die Synthese erfolgt nach AAV3 aus 100 mg (0.57 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**), 109 mg (0.62 mmol) (4-Methoxyphenyl)hydrazin-Hydrochlorid

(**44i**) und 51 mg (0.62 mmol) Natriumacetat. Nach Umkristallisation werden 61 mg (38 %) eines grauen Pulvers erhalten.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3164 cm<sup>-1</sup> (NH), 3053 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2954 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1678 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.63 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.84 (dd, 1H, 8.8/2.4 Hz, arom. H), 7.17 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 7.21 (d, 1H, 2.4 Hz, arom. H), 7.35 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 8.41 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 8.90 (s, 1H, arom. H), 10.49 (s, 1H, NH), 11.57 (s, 1H, arom. H); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (CH<sub>3</sub>), 31.8 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 99.5, 112.3, 113.1, 115.5, 148.1 (2C) (tert. arom. C-Atome), 108.1, 118.3, 126.8, 130.3, 132.9, 141.4, 153.7 (quart. arom. C-Atome), 171.4 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) [279.30] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 279.10077, gefunden: 279.10001; Reinheit: 99.6%/99.8 % (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.06 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 80/20, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

#### 12-Methyl-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**3o**)



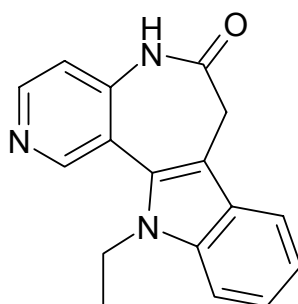
Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 100 mg (0.57 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) und 76 mg (0.62 mmol) 1-Methyl-1-phenylhydrazin (**44o**). Nach Umkristallisation werden 36 mg (24 %) eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: >330 °C (Dunkelfärbung ab 260 °C); IR (KBr): 3198 cm<sup>-1</sup> (NH), 3052 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2964 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1666 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.54 (bs, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.16 („dt“, 1H, 7.9/7.1/0.8 Hz, arom. H), 7.26 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 7.29 („dt“, 1H, 8.2/7.0/1.1 Hz, arom. H), 7.58 (d, 1H, 8.3 Hz, arom. H), 7.74 (d, 1H, 7.9 Hz, arom. H), 8.50 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 8.94 (s, 1H, arom. H), 10.49 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6



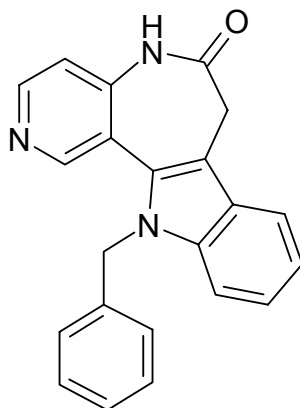
MHz):  $\delta$  (ppm) = 31.8 (CH<sub>3</sub>), 31.6 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 110.4, 116.3, 118.1, 119.7, 122.7, 148.2, 149.7 (tert. arom. C-Atome), 110.4, 117.5, 125.2, 131.0, 139.1, 142.5 (quart. arom. C-Atome), 172.1 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O) [263.30] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 263.10587, gefunden: 263.10550; Reinheit: 99.9%/99.4% (HPLC,  $t_s$  = 3.75 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 60/40, Säulenofentemperatur 40 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

12-Ethyl-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (3p)



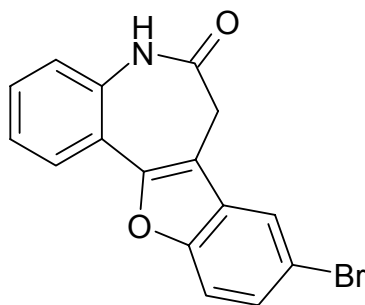
Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 129 mg (0.73 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) und 109 mg (0.80 mmol) 1-Ethyl-1-phenylhydrazin (**44p**). Nach Umkristallisation werden 39 mg (19 %) eines beigen Pulvers erhalten.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3188 cm<sup>-1</sup> (NH), 3064 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2942 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1670 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.27 (t, 3H, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.53 (br. s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 4.34 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.14 – 7.18 (m, 1H, arom. H), 7.27 – 7.31 (m, 2H, arom. H), 7.62 (d, 1H, 8.3 Hz, arom. H), 7.74 (d, 1H, 7.9 Hz, arom. H), 8.51 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 8.86 (s, 1H, arom. H), 10.46 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 15.0 (CH<sub>3</sub>), 31.6 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 39.2 (CH<sub>2</sub>), 111.2, 116.4, 118.2, 119.8, 122.8, 148.3, 148.9 (tert. arom. C-Atome), 110.7, 117.7, 125.6, 130.3, 138.3, 142.5 (quart. arom. C-Atome), 172.3 (C=O); EI/HRMS (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O) [277.33] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 277.12149, gefunden: 277.12060; Reinheit: 99.6%/99.9% (HPLC,  $t_s$  = 8.04 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.55: 60/40, Säulenofentemperatur 40 °C,  $t_m$ (DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

12-Benzyl-7,12-dihydropyrido[4',3':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**3q**)

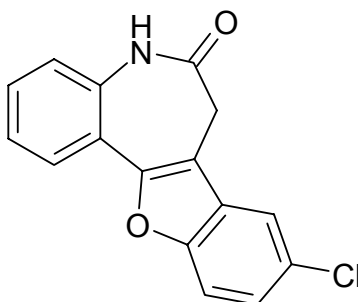
Die Synthese erfolgt nach AAV5 aus 145 mg (0.82 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**), 213 mg (0.91 mmol) 1-Benzyl-1-phenylhydrazin-Hydrochlorid (**44q**) und 74 mg (0.91 mmol) Natriumacetat. Nach Umkristallisation werden 33 mg (12 %) eines farblosen Pulvers erhalten.

Schmp.: 314 – 315 °C (Zersetzung), IR (KBr): 3436 cm<sup>-1</sup> (NH), 3062 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2889 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1697 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.75 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 5.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.85 – 6.87 (m, 2H, arom. H), 7.17 – 7.26 (m, 4H, arom. H), 7.31 ("dt", 1H, 8.2/7.0/1.1 Hz, arom. H), 7.55 (d, 1H, 8.3 Hz, arom. H), 7.59 (d, 1H, 6.4 Hz, arom. H), 7.86 (d, 1H, 7.9 Hz, arom. H), 8.64 (d, 1H, 6.4 Hz, arom. H), 8.89 (s, 1H, arom. H), 11.26 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 47.4 (CH<sub>2</sub>), 110.9, 118.6, 119.8, 122.6, 123.4, 126.3 (2C), 126.9, 128.3 (2C), 130.3, 144.3 (tert. arom. C-Atome), 112.5, 125.4, 131.8, 133.1, 138.6, 138.8, 141.2 (quart. arom. C-Atome), 171.8 (C=O); EI/HRMS (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O) [339.40] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 339.13715, gefunden: 339.13584; Reinheit: 99.2%/99.9% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.87 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 60/40, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Brom-5,7-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-d][1]benzazepin-6-on (4a)

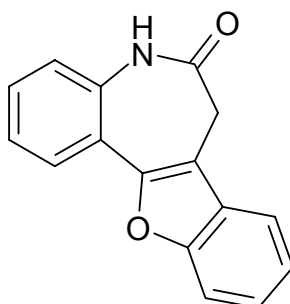
Die Synthese erfolgt nach AAV7 aus 104 mg (0.30 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-[O-(4-bromphenyl)oxim] **72a** unter Erhalt von 39 mg (38 %) einer grauen Substanz.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3189 cm<sup>-1</sup> (NH), 3065 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2966 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1680 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO + TFA, 600 MHz): δ (ppm) = 3.69 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.30 – 7.34 (m, 2H, arom. H), 7.46 – 7.49 (m, 1H, arom. H), 7.54 (dd, 1H, 8.7/2.0 Hz, arom. H.), 7.65 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.87 (dd, 1H, 7.8/1.4 Hz, arom. H), 8.12 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 10.41 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO + TFA, 150,9 MHz): δ (ppm) = 30.2 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 113.5, 122.27, 122.31, 124.0, 126.1, 127.8, 130.1 (tert. arom. C-Atome), 110.6, 115.9, 119.8, 130.3, 136.1, 151.1, 154.0 (quart. arom. C-Atome), 170.8 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>) [345.20] berechnet: C 58.56, H 3.07, N 4.27, gefunden: C 58.31, H 3.05, N 4.11; Reinheit: 99.7%/99.7% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.80 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 60/40, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

9-Chlor-5,7-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-d][1]benzazepin-6-on (4e)

Die Synthese erfolgt nach AAV7 aus 71 mg (0.24 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-[O-(4-bromphenyl)oxim] **72e** unter Erhalt von 35 mg (52 %) einer farblosen Substanz.

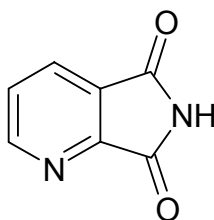
Schmp.: 320 °C; IR (KBr): 3191 cm<sup>-1</sup> (NH), 3068 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2964/2910 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1685 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.67 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.28 – 7.32 (m, 2H, arom. H), 7.40 (dd, 1H, 8.7/2.2 Hz, arom. H), 7.47 ("dt", 8.1/7.5/1.6 Hz, arom. H), 7.71 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 7.83 (dd, 1H, 8.4/1.7 Hz, arom. H), 7.99 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H), 10.38 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 30.0 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 113.0, 119.2, 122.0, 123.8, 124.9, 125.9, 129.9 (tert. arom. C-Atome), 110.5, 119.5, 127.8, 129.5, 135.7, 150.9, 153.3 (quart. arom. C-Atome), 170.5 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>2</sub>) [283.72] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 283.04001, gefunden: 283.03997, Reinheit: 99.9%/99.8% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.45 min, ACN/Wasser-Trifluoressigsäure pH 2.11: 60/40)

5,7-Dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-d][1]benzazepin-6-on (4g)

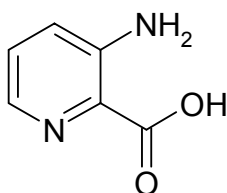
Die Synthese erfolgt nach AAV7 aus 137 mg (0.51 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-(*O*-phenyloxim) **72g** unter Erhalt von 94 mg (74 %) farblosen Nadeln.

Schmp.: 298 – 300 °C; IR (KBr): 3191 cm<sup>-1</sup> (NH), 3058 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2976 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1675 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.65 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.28-7.47 (m, 5H, arom. H), 7.68 (d, 1H, 8.0 Hz, arom. H), 7.81-7.85 (m, 2H, arom. H), 10.37 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 30.2 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 110.8, 119.4, 121.9, 123.2, 123.7, 125.1, 125.7, 129.5 (tert. arom. C-Atome), 111.4, 119.9, 127.8, 135.5, 149.2, 154.8 (quart. arom. C-Atome), 170.6 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>) [249.27] berechnet: C 77.10, H 4.45, N 5.62, gefunden: C 76.78, H 4.34, N 5.72; Reinheit: 99.6%/99.2% (HPLC, t<sub>s</sub> = 5.87 min, ACN/Wasser: 20/80, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

5*H*-Pyrrolo[3,4-*b*]pyridin-5,7(6*H*)-dion (**30**)

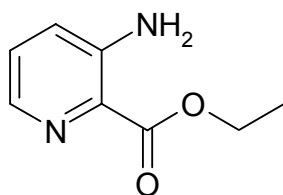


22.5 g (135 mmol) Pyridin-2,3-dicarbonsäure (**28**) werden im tarierten Kolben mit 25.0 g Acetanhydrid bis zur Lösung erwärmt. Über den Zeitraum einer Stunde destilliert man Eisessig und Acetanhydrid ab bis die Kolbeninnentemperatur 160 °C aufweist. Es wird Acetanhydrid bis zum Gewicht von 12.0 g ergänzt und 14.0 g (237 mmol) Acetamid dem Ansatz zugefügt. Man rührt für 8 Stunden bei 125 °C, lässt abkühlen und bewahrt den Ansatz über Nacht im Kühlschrank auf. Der Ansatz wird mit kaltem Wasser gewaschen und anschließend in 100 ml heißem Wasser suspendiert. Nach Abkühlen wird der braunschwarze Feststoff abgesaut. Ausbeute: 12.77 g (64 %) (Lit.: 75 %)<sup>151</sup>  
Schmp.: 240 °C (Lit.: 230 °C)<sup>151</sup>

3-Aminopyridin-2-carbonsäure (31)

10.0 g (67.5 mmol) 5*H*-Pyrrolo[3,4-*b*]pyridin-5,7(6*H*)-dion (**30**) werden in 200 ml eiskalter 10-prozentiger Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Daraufhin fügt man eine frisch aus 70 ml eiskalter 15-prozentiger Natriumhydroxid-Lösung und 11.2 g (70 mmol) Brom hergestellte Natriumhypobromit-Lösung zu dem Ansatz und lässt für eine Stunde bei Raumtemperatur und eine Stunde bei 85 °C rühren. Nach Abkühlen wird mit 50-prozentiger Schwefelsäure auf pH 5 eingestellt und der Ansatz für 48 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Der entstandene Niederschlag wird abgetrennt und das erhaltene Filtrat wird in eine Lösung aus 14.17 g (71 mmol) Kupfer(II)-acetat-Monohydrat, 7 ml Eisessig und 280 ml heißem Wasser gegossen. Der entstehende graue Niederschlag wird abfiltriert, getrocknet und in 250 ml heißem Wasser suspendiert. In die Suspension wird Schwefelwasserstoff eingeleitet. Das ausgefällte Kupfersulfid wird abfiltriert und das gewonnene Filtrat im Vakuum eingengt. Dabei fallen 3.31 g (36 %) eines gelben kristallinen Stoffes aus.

Schmp.: 208 °C (Lit.: 210 °C).<sup>152</sup>

3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (34a)

Methode A:

5.00 g (36.19 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**31**) werden in 70 ml trockenem Ethanol und 6 ml konzentrierter Schwefelsäure zum Rückfluss für 90 Stunden

erhitzt. Der Ansatz wird nach Ende der Reaktion im Vakuum auf ca. 20 ml eingeeengt. Unter Eiskühlung wird der Ansatz langsam mit 25-prozentiger Ammoniak-Lösung alkalisiert und mit 5 x 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Man erhält 3.70 g (62 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 129 °C (Lit.: 132 °C).<sup>152</sup>

#### Methode B:

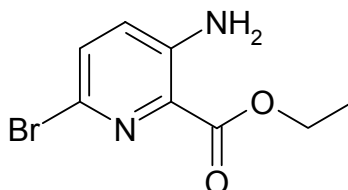
1.00 g (7.25 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**31**) wird bei Raumtemperatur in 30 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 2.00 g (14.5 mmol) Kaliumcarbonat wird für 30 Minuten gerührt. Anschließend werden 1.13 g (7.25 mmol) Ethyliodid in 20 ml DMF zugetropft und es wird für weitere 3 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Reaktion gießt man auf 145 ml Eiswasser und extrahiert den Ansatz mit Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Man erhält 167 mg (17 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 131 °C (Lit.: 132 °C).<sup>152</sup>

#### Methode C:

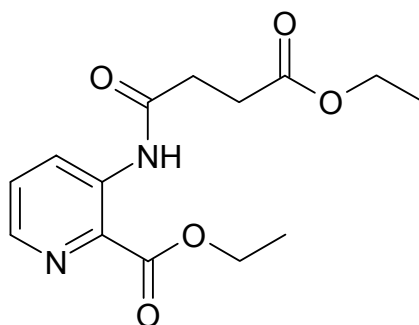
138 mg (1.00 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**31**) werden in 0.35 ml trockenem Ethanol und 0.15 ml konzentrierter Schwefelsäure in einem Synthesemikrowellengerät erhitzt. Folgende Parameter wurden gewählt: ramp time 2:00 Minuten, Reaktionstemperatur 120 °C, Reaktionszeit 10 Minuten. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf 5 ml Eiswasser gegossen, mit 25-prozentiger Ammoniak-Lösung alkalisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Man erhält 17 mg (10 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 129 °C (Lit.: 132 °C).<sup>152</sup>

3-Amino-6-brompyridin-2-carbonsäureethylester (34b)

3.70 g (22.29 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester werden in 55 ml Wasser unter Zusatz von wenigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Dazu tropft man bei Raumtemperatur eine Lösung von 3.57 g (22.31 mmol) Brom in 9.5 ml Eisessig. Der ausfallende gelbe Niederschlag wird abgesaugt. Die Mutterlauge wird mit Kaliumhydroxid-Plätzchen alkalisiert und der entstehende Niederschlag wird ebenfalls abgesaugt. Die vereinigten Niederschläge werden mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 4.05 g (74 %) hellgelbe Kristalle (Lit.: 65 %).<sup>158</sup>

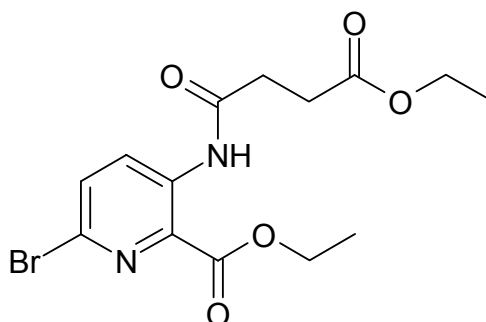
Schmp.: 185 – 186 °C (181.5 – 183.5 aus 50-prozentigem Ethanol)<sup>158</sup>; IR (KBr): 3321 cm<sup>-1</sup> (NH), 2979/2900 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1687 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.30 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.88 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.21 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 7.44 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 14.2 (CH<sub>3</sub>), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 128.6, 132.3 (tert. arom. C-Atome), 124.3, 125.6, 147.5 (quart. arom. C-Atome), 165.9 (C=O); (C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [245.08] berechnet: C 39.21, H 3.70, N 11.43, gefunden: C 39.27, H 3.69, N 11.19.

3-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (41a)



2.73 g (27.27 mmol) Calciumcarbonat werden mit 2.25 g (13.5 mmol) 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester in 33 ml trockenem Toluol im Eiswasserbad gerührt. Zu dieser Suspension tropft man über 90 Minuten eine Lösung aus 2.79 g (18.3 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 33 ml trockenem Toluol. Anschließend wird 7 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird heiß filtriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingengt. Der gelbliche Feststoff wird in 50 ml Ethylacetat gelöst und dreimal mit 10 ml 7-prozentiger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit 10 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Man erhält 3.34 g (84 %) eines farblosen Feststoffs (Lit. 80 %).<sup>150</sup> Schmp.: 67 °C (Lit.: 67.5 °C).<sup>150</sup>

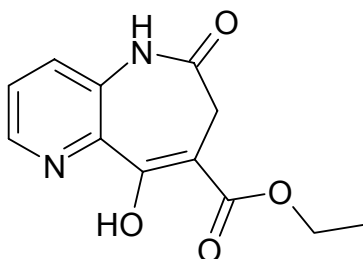
6-Brom-3-[(4-ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**41b**)



3.96 g (39.57 mmol) Calciumcarbonat werden mit 5.01 g (20.44 mmol) 3-Amino-6-brompyridin-2-carbonsäureethylester (**34b**) in 50 ml trockenem Toluol im Eiswasserbad gerührt. Zu dieser Suspension tropft man eine Lösung aus 4.05 g (24.0 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 50 ml trockenem Toluol. Anschließend wird 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird heiß filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Das entstehende gelbe Öl wird in Ethanol erwärmt. Beim Abkühlen bilden sich farblose Kristalle, die abgesaugt werden. Ausbeute 6.64 g (87 %).

Schmp.: 85 – 87 °C; IR (KBr): 3247 cm<sup>-1</sup> (NH), 3104 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2981/2929 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1737/1705/1691 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.17 (t, 3H, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.32 (t, 3H, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 2.57 – 2.61 und 2.67 – 2.70 (m, 4H, AA'XX' – System, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 4.06 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.33 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.85 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 8.34 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 10.46 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 13.9, 14.0 (CH<sub>3</sub>), 28.5, 31.2 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 59.9, 61.7 (O–CH<sub>2</sub>), 131.7, 133.2 (tert. arom. C-Atome), 133.3, 135.1, 137.4 (quart. arom. C-Atome), 164.5, 170.6, 172.0 (C=O); (C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) [373.21] berechnet: C 45.06, H 4.59, N 7.51; gefunden: C 45.08, H 4.64, N 7.68.

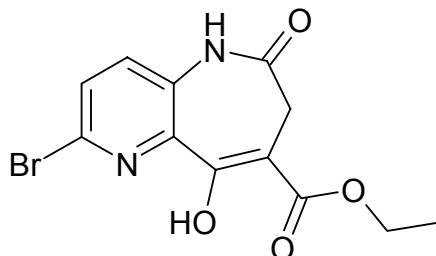
9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**42a**)



2.25 g (56.05 mmol) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit) werden unter Stickstoffbegasung dreimal mit 7 ml trockenem Toluol gewaschen und anschließend in 7 ml trockenem Toluol suspendiert. Dazu wird eine Lösung aus 3.30 g (11.21 mmol) 3-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**41a**) in 40 ml trockenem Toluol und 5 ml trockenem DMF unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Silikonölbäd in die vorgelegte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bis zur vollständigen Umsetzung bei 70 - 75 °C gerührt. Nach Abkühlen wird mit 3.5 ml Eisessig vorsichtig neutralisiert und anschließend vorsichtig 35 ml Wasser zugegetropft. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 1.33 g (48 %) farblose Kristalle (Lit.: 43 %).<sup>150</sup>

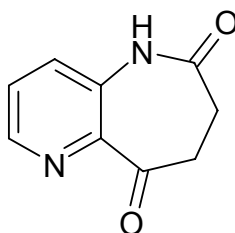
Schmp.: 220 °C (Lit.: 221 °C).<sup>150</sup>

2-Brom-9-hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**42b**)



4.81 g (120.0 mmol) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit) werden unter Stickstoffbegasung dreimal mit 10 ml trockenem Toluol gewaschen und anschließend in 10 ml trockenem Toluol suspendiert. Dazu wird eine Lösung aus 7.06 g (18.92 mmol) 6-Brom-3-[(4-ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**41b**) in 90 ml trockenem Toluol und 10 ml trockenem DMF unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Silikonölbad in die vorgelegte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bis zur vollständigen Umsetzung bei 50 °C für 2 Stunden gerührt. Nach Abkühlen wird mit 7.2 ml Eisessig vorsichtig neutralisiert und anschließend vorsichtig 75 ml Wasser zugetropft. Der Ansatz wird im Eiswasserbad kräftig gerührt, der dabei entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 2.72 g (44 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 208 °C; IR (KBr): 3427 cm<sup>-1</sup> (OH), 3215 cm<sup>-1</sup> (NH), 3129 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.); 2954 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1696/1648 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.02 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 4.31 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.52 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.79 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 10.53 (s, 1H, NH), 12.09 (s, 1H, OH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 14.0 (CH<sub>3</sub>), 30.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH<sub>2</sub>), 130.3, 133.1 (tert. arom. C-Atome), 98.7, 134.5, 135.4, 141.7, 162.9 (quart. arom. C-Atome), 169.8, 171.7 (C=O); (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) [327.14] berechnet: C 44.06, H 3.39, N 8.56, gefunden: C 44.15, H 3.39, N 8.65.

7,8-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**)

## Methode A:

125 mg (0.5 mmol) 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**42a**) werden in einem Zweihalskolben (Volumen 25 ml) in 10 ml DMF bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Alle 30 Minuten gibt man 2 Tropfen Wasser hinzu. Nach 5 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum evaporiert. Der verbleibende Rückstand wird ohne zusätzliche Aufreinigung weiterverarbeitet.

Mittels Mitteldruckchromatographie lässt sich **43a** über eine RP-18-Säule reinigen. Nach kurzer Waschphase mit reinem Wasser wird mit 5-prozentigem Methanol eluiert<sup>150</sup>.

Ausbeute (ungereinigt): 72 mg (81 %) (Lit.: 95 %).<sup>150</sup>

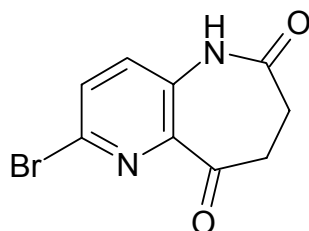
Schmp.: 180 °C (Lit.: 185.5 °C).<sup>150</sup>

## Methode B:

100 mg (0.4 mmol) 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**42a**) werden in einem Mikrowellenreaktionsgefäß in 8 ml DMF und 6 Tropfen Wasser unter folgender Parametrisierung in einem Synthese-Mikrowellengerät erhitzt: ramp time 2 Minuten, Reaktionszeit 40 Minuten, Temperatur 160 °C. Bei Verlängerung der Reaktionsdauer war keine weitere Umsetzung festzustellen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum evaporiert. Man erhält einen beigefarbenen Niederschlag.

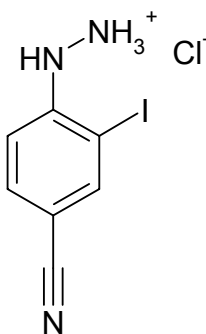
Ausbeute: 43 mg (59 %).

Schmp.: 177 °C.

2-Brom-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**43b**)

327 mg (1.0 mmol) 2-Brom-9-hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-carbonsäureethylester (**42b**) werden in 50 ml DMF bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Alle 30 Minuten gibt man 2 Tropfen Wasser hinzu. Nach 5 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum evaporiert. Der entstehende Rückstand wird in DMSO aufgenommen und mittels präparativer HPLC gereinigt. Eluent Wasser/Acetonitril 90:10. Die Fraktion, die **43b** enthält, wird im Vakuum eingeeengt. Dabei kristallisieren 193 mg (77 %) farblose, feine Nadeln.

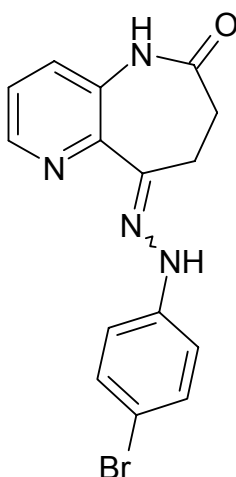
Schmp.: 234 °C (Zersetzung, Dunkelfärbung ab 228 °C); IR (KBr): 3200  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3099/3036  $\text{cm}^{-1}$  (CH-arom.), 2976  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1681  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.74 – 2.77 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin-CH<sub>2</sub>), 2.95 – 2.98 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.54 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.78 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 10.23 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 28.7, 37.8 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 131.8, 133.7 (tert. arom. C-Atome), 134.5, 136.8, 142.3 (quart. arom. C-Atome), 173.2, 195.4 (C=O); (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [250.07] berechnet: C 42.38, H 2.77, N 10.98, gefunden: C 42.39, H 2.71, N 10.54.

4-Hydrazino-3-iodbenzonitril-Hydrochlorid (**44m**)

Zu einer Lösung von 1.06 g (4.35 mmol) 4-Amino-3-iodbenzonitril (**84**) in 9 ml konzentrierter Salzsäure, die bei einer Kolbeninnentemperatur von -15 °C gerührt wird, gibt man tropfenweise eine Lösung von 304 mg (4.35 mmol) Natriumnitrit in 4.5 ml Wasser. Dabei ist darauf zu achten, dass die Temperatur nicht auf über -10 °C steigt. Unter kräftigem Rühren wird die Mischung in eine vorgekühlte Lösung (-20 °C) aus 2.17 g (9.57 mmol) Zinn(II)-chlorid-Dihydrat in 3.5 ml konzentrierter Salzsäure gegossen. Dabei muss die Temperatur unter -10 °C gehalten werden. Nach der Zugabe wird der entstehende Niederschlag abgesaugt und mit Ether gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 630 mg (49 %) gelbe Kristalle.

Schmp.: 197 °C, IR (KBr): 3411/3303  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3048  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 2922/2580  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_3^+$ ), 2221  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ),  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.02 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.84 (dd, 1H, 8.6/1.9 Hz, arom. H), 8.15 (br. s, 1H, NH), 8.22 (d, 1H, 1.9 Hz, arom. H), 10.01 (br. s, 2H,  $\text{NH}_2$ ),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 113.0, 133.1, 142.3 (tert. arom. C-Atome), 83.7, 104.3, 117.8, 149.0 (quart. arom. C-Atome), ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClIN}_3$ ) [295.51] berechnet: C 28.45, H 2.39, N 14.22, gefunden: C 28.56, H 2.33, N 14.29.

7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion-9-[(4-bromphenyl)hydrazon] (**45a**)

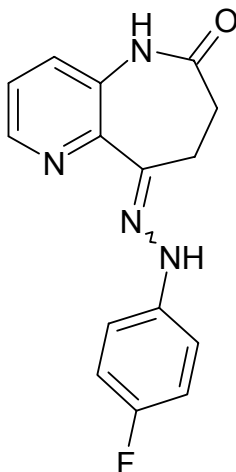


Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 208 mg (1.17 mmol) 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**43a**), 284 mg (1.29 mmol) (4-Bromphenyl)hydrazin-Hydrochlorid

(**44a**) und 105 mg (1.29 mmol) Natriumacetat. Man erhält 181 mg (44 %) einer ockerfarbenen Substanz (Lit.: 75 %).<sup>150</sup>

Schmp.: 217 °C (Lit.: 217 °C).<sup>150</sup>

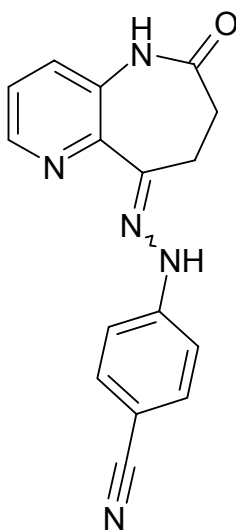
7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-fluorphenyl)hydrazon] (**45b**)



Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 183 mg (1.04 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 184 mg (1.14 mmol) (4-Fluorphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44b**) und 90 mg (1.14 mmol) Natriumacetat. Nach Eingießen in die Natriumacetat-Lösung wird mit 4 x 40 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum wird das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 171 mg (58 %) einer gelben Substanz.

Schmp.: 231-232 °C; IR (KBr): 3286/3119 cm<sup>-1</sup> (NH); 3061 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2956/2888 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1674 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.54-2.58 (m, 2H, Teil eines AA'XX'-Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.01-3.04 (m, 2H, Teil eines AA'XX'-Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.03-7.07 (m, 2H, arom. H), 7.16-7.20 (m, 2H, arom. H), 7.33-7.40 (m, 2H, arom. H), 8.40 (dd, 1H, 4.4/1.6 Hz, arom. H), 9.35 (s, 1H, NH), 9.77 (s, 1H, NH); (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>4</sub>O x 0.5 H<sub>2</sub>O) [293.30] berechnet: C 61.43; H 4.81, N 19.10, gefunden: C 61.56, H 4.78, N 18.64.

4-[2-(6-Oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9H-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril  
**(45c)**

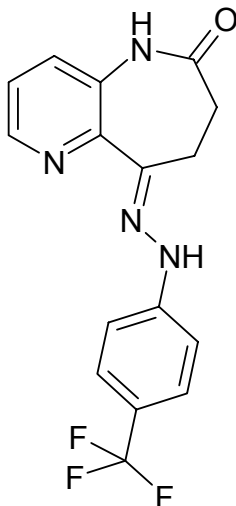


Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 260 mg (1.48 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 275 mg (1.62 mmol) 4-Hydrazinobenzonitril-Hydrochlorid (**44c**) und 130 mg (1.62 mmol) Natriumacetat. Man erhält 310 mg (72 %) gelbe Kristalle.

Schmp.: 273 °C; IR (KBr): 3278/3185 cm<sup>-1</sup> (NH), 3120 cm<sup>-1</sup>/ 3063 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2957 cm<sup>-1</sup>/2888 cm<sup>-1</sup>, 2218 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1673 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.56 - 2.60 und 3.06 - 3.10 (m, AA'XX'-System, 4H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.27 - 7.31 (m, Teil eines AA'XX'-System, 2H, arom. H), 7.37 - 7.43 (m, 2H, arom. H), 7.61 - 7.64 (m, Teil eines AA'XX'-System, 2H, arom. H), 8.42 (dd, 1H, 4.2/1.9 Hz, arom. H), 9.80 (s, 1H, NH), 9.92 (s, 1H, NH), (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O) [291.31] berechnet: C 65.97, H 4.50, N 24.04, gefunden: C 65.96, H 4.54, N 22.54.



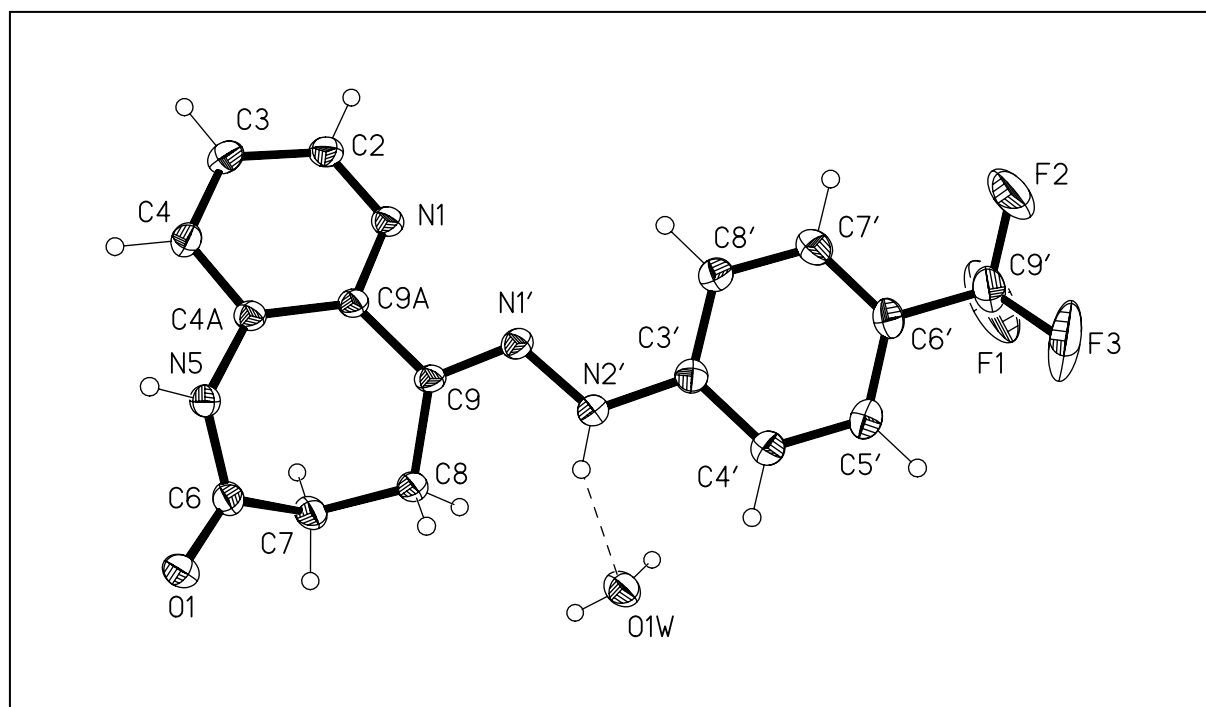
(9E)-7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion-9-([4-trifluormethyl]phenyl)hydrazon} (**45d**)

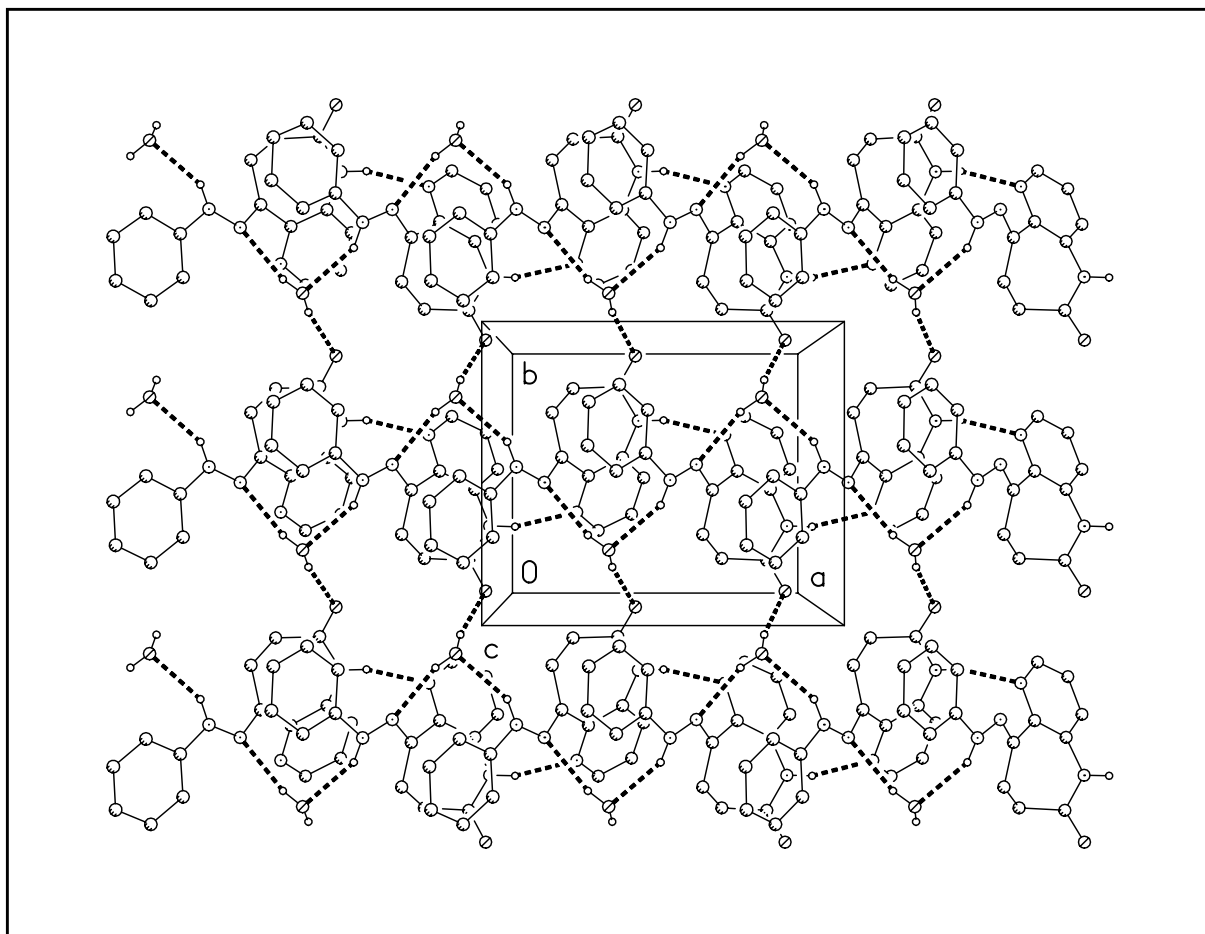


Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 176 mg (1.00 mmol) 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**43a**) und 264 mg (1.5 mmol) [4-(Trifluormethyl)phenyl]hydrazin (**44d**). Man erhält 197 mg (59 %) einer gelben Substanz. Die Züchtung der Einkristalle erfolgte in einem Gemisch aus Ethanol/Petrolether 1:5.

Schmp.: 229 – 230 °C; IR (KBr): 3283  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 2969/2897  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1678  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.58-2.61 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 3.07-3.10 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 7.35 (d, 2H, 8.6 Hz, arom. H), 7.41-7.47 (m, 2H, arom. H), 7.56 (d, 2H, 8.7 Hz, arom. H), 8.44 (dd, 1H, 4.4/1.6 Hz, arom. H), 9.84 (s, 1H, NH), 9.86 (s, 1H, NH),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 29.8, 30.5 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , Azepin), 112.9, 123.8, 126.2 (q,  $^3J_{\text{C,F}} = 4$  Hz,  $\text{C-C-CF}_3$ ), 129.9, 145.1 (tert. arom. C-Atome), 119.4 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 32$  Hz,  $\text{C-CF}_3$ ), 124.9 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 270$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 134.6, 144.0, 147.4, 148.5 (quart. arom. C-Atome), 172.8 (C=O); ( $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}$ ) [334.30] berechnet: C 57.49, H 3.92, N 16.76; gefunden: C 57.29, H 3.99, N 16.35.

Abbildung 11-3: Röntgenkristallstruktur von **45d**<sup>a</sup>





<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

## Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$	
$M_r$	352.32	
Temperatur	133(2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	Orthorhombisch	
Raumgruppe	$\text{Pca}2_1$	
Gitterkonstanten	$a = 9.9531(11)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 8.3554(11)$ Å	$\beta = 90^\circ$
	$c = 19.049(2)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$1584.2(3)$ Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Dichte (berechnet)	1.477 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorptionskoeffizient	0.124 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	728	
Kristallgröße	0.40 x 0.33 x 0.20 mm <sup>3</sup>	
$\theta$ -Bereich für die Datensammlung	2.14 to 30.58°	
Limitierende Indices	$-14 \leq h \leq 14$ , $-11 \leq k \leq 11$ , $-27 \leq l \leq 27$	
Zahl der Reflexionen	31431	
Unabhängige Reflexionen	2489 [ $R(\text{int}) = 0.0344$ ]	
Vollständigkeit bis $\theta = 30.00^\circ$	100.0 %	
Absorptionskorrektur	Semi-empirisch von Äquivalenten	
Max. and min. Transmission	0.9756 and 0.8846	
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on $F^2$	
Daten / Einschränkungen / Parameter	2489 / 7 / 255	
Goodness-of-fit on $F^2$	1.048	
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R1 = 0.0406$ , $wR2 = 0.0995$	
R indices (alle Daten)	$R1 = 0.0499$ , $wR2 = 0.1083$	
Größte Differenzpeaks	0.341 and -0.326 e.Å <sup>-3</sup>	

Tabelle 11-5: Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ).  $U(\text{eq})$  ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$  Tensors<sup>a,b</sup>.

	x	y	z	U(eq)
N(1)	2315.3(19)	3444(2)	1711.7(11)	20.9(4)
N(5)	4391.9(19)	7109(2)	1886.8(11)	19.7(3)
N(1')	1291.0(19)	4647(2)	2908.9(10)	19.7(4)
N(2')	412(2)	5255(2)	3383.5(11)	22.2(4)
C(2)	3029(2)	2677(3)	1219.9(13)	23.3(4)
C(3)	4169(2)	3329(3)	910.0(13)	24.5(4)
C(4)	4581(2)	4827(3)	1126.5(12)	21.2(4)
C(4A)	3864(2)	5639(2)	1648.8(11)	18.7(4)
C(6)	3703(2)	8475(3)	2018.8(13)	22.3(4)
C(7)	2198(2)	8408(3)	1917.4(15)	24.9(5)
C(8)	1528(2)	7411(3)	2488.6(14)	23.3(4)
C(9A)	2714(2)	4905(2)	1931.8(11)	17.7(4)
C(9)	1847(2)	5646(2)	2478.3(12)	17.8(4)
O(1)	4290.2(18)	9685.6(19)	2214.6(11)	29.2(4)
C(3')	-391(2)	4217(3)	3771.1(12)	20.4(4)
C(4')	-1331(3)	4901(3)	4231.3(13)	24.9(4)
C(5')	-2238(3)	3944(3)	4585.9(13)	26.7(5)
C(6')	-2200(2)	2288(3)	4492.3(12)	24.3(4)
C(7')	-1235(3)	1604(3)	4060.4(13)	26.3(5)
C(8')	-323(2)	2551(3)	3702.8(13)	24.7(4)
C(9')	-3284(3)	1277(3)	4800.9(14)	32.5(6)
F(1)	-4389(3)	1317(4)	4406.4(19)	81.0(13)
F(2)	-3013(3)	-269(3)	4818(2)	85.3(14)
F(3)	-3678(4)	1723(4)	5419.5(14)	86.8(16)
F(1')	-3698(18)	220(20)	4398(8)	51(5)
F(2')	-4368(19)	2060(20)	4959(13)	69(6)
F(3')	-2780(20)	590(30)	5360(10)	68(6)
O(1W)	-1587(2)	7979(2)	3198.0(11)	28.9(4)

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b</sup>Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Table 11-6: Bindungslängen [Å] und -winkel [°]<sup>a,b</sup>.

N(1)-C(2)	1.339(3)	C(7)-C(8)	1.524(3)
N(1)-C(9A)	1.351(3)	C(8)-C(9)	1.508(3)
N(5)-C(6)	1.355(3)	C(9A)-C(9)	1.488(3)
N(5)-C(4A)	1.411(3)	C(3')-C(8')	1.399(3)
N(1')-C(9)	1.294(3)	C(3')-C(4')	1.404(3)
N(1')-N(2')	1.357(3)	C(4')-C(5')	1.383(3)
N(2')-C(3')	1.391(3)	C(5')-C(6')	1.396(3)
C(2)-C(3)	1.390(3)	C(6')-C(7')	1.387(3)
C(3)-C(4)	1.380(3)	C(6')-C(9')	1.491(3)
C(4)-C(4A)	1.399(3)	C(7')-C(8')	1.384(3)
C(4A)-C(9A)	1.406(3)	C(9')-F(3)	1.297(4)
C(6)-O(1)	1.226(3)	C(9')-F(2)	1.320(4)
C(6)-C(7)	1.512(3)	C(9')-F(1)	1.332(4)
C(2)-N(1)-C(9A)	119.58(19)	N(1')-C(9)-C(8)	122.17(19)
C(6)-N(5)-C(4A)	127.2(2)	C(9A)-C(9)-C(8)	122.56(19)
C(9)-N(1')-N(2')	117.16(18)	N(2')-C(3')-C(8')	122.9(2)
N(1')-N(2')-C(3')	119.38(18)	N(2')-C(3')-C(4')	117.4(2)
N(1)-C(2)-C(3)	122.9(2)	C(8')-C(3')-C(4')	119.7(2)
C(4)-C(3)-C(2)	118.1(2)	C(5')-C(4')-C(3')	120.3(2)
C(3)-C(4)-C(4A)	120.1(2)	C(4')-C(5')-C(6')	119.6(2)
C(4)-C(4A)-C(9A)	118.44(19)	C(7')-C(6')-C(5')	120.2(2)
C(4)-C(4A)-N(5)	117.42(19)	C(7')-C(6')-C(9')	120.1(2)
C(9A)-C(4A)-N(5)	124.03(19)	C(5')-C(6')-C(9')	119.4(2)
O(1)-C(6)-N(5)	120.7(2)	C(8')-C(7')-C(6')	120.7(2)
O(1)-C(6)-C(7)	122.8(2)	C(7')-C(8')-C(3')	119.5(2)
N(5)-C(6)-C(7)	116.5(2)	F(3)-C(9')-F(2)	108.7(3)
C(6)-C(7)-C(8)	111.3(2)	F(3)-C(9')-F(1)	104.8(3)
C(9)-C(8)-C(7)	115.68(19)	F(2)-C(9')-F(1)	102.0(3)
N(1)-C(9A)-C(4A)	120.97(19)	F(3)-C(9')-C(6')	114.4(2)
N(1)-C(9A)-C(9)	115.03(18)	F(2)-C(9')-C(6')	114.6(2)
C(4A)-C(9A)-C(9)	124.00(18)	F(1)-C(9')-C(6')	111.2(2)
N(1')-C(9)-C(9A)	115.02(18)		

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b</sup>Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung

Table 11-7: Torsionswinkel [ $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup>.

C(9)-N(1')-N(2')-C(3')	168.5(2)	C(4')-C(5')-C(6')-C(7')	1.7(4)
C(9A)-N(1)-C(2)-C(3)	-1.1(3)	C(4')-C(5')-C(6')-C(9')	-172.2(2)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	0.5(4)	C(5')-C(6')-C(7')-C(8')	-1.7(4)
C(2)-C(3)-C(4)-C(4A)	0.6(3)	C(9')-C(6')-C(7')-C(8')	172.1(2)
C(3)-C(4)-C(4A)-C(9A)	-1.2(3)	C(6')-C(7')-C(8')-C(3')	-0.9(4)
C(3)-C(4)-C(4A)-N(5)	175.2(2)	N(2')-C(3')-C(8')-C(7')	-174.3(2)
C(6)-N(5)-C(4A)-C(4)	137.3(2)	C(4')-C(3')-C(8')-C(7')	3.6(4)
C(6)-N(5)-C(4A)-C(9A)	-46.5(3)	C(7')-C(6')-C(9')-F(3)	146.8(3)
C(4A)-N(5)-C(6)-O(1)	-178.9(2)	C(5')-C(6')-C(9')-F(3)	-39.4(4)
C(4A)-N(5)-C(6)-C(7)	1.6(3)	C(7')-C(6')-C(9')-F(2)	20.3(4)
O(1)-C(6)-C(7)-C(8)	-108.3(3)	C(5')-C(6')-C(9')-F(2)	-165.9(3)
N(5)-C(6)-C(7)-C(8)	71.2(3)	C(7')-C(6')-C(9')-F(1)	-94.7(3)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-67.1(3)	C(5')-C(6')-C(9')-F(1)	79.2(4)
C(2)-N(1)-C(9A)-C(4A)	0.4(3)		
C(2)-N(1)-C(9A)-C(9)	179.9(2)	<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.	
C(4)-C(4A)-C(9A)-N(1)	0.7(3)		
N(5)-C(4A)-C(9A)-N(1)	-175.4(2)		
C(4)-C(4A)-C(9A)-C(9)	-178.8(2)		
N(5)-C(4A)-C(9A)-C(9)	5.1(3)		
N(2')-N(1')-C(9)-C(9A)	-175.20(18)		
N(2')-N(1')-C(9)-C(8)	-0.9(3)		
N(1)-C(9A)-C(9)-N(1')	32.7(3)		
C(4A)-C(9A)-C(9)-N(1')	-147.8(2)		
N(1)-C(9A)-C(9)-C(8)	-141.6(2)		
C(4A)-C(9A)-C(9)-C(8)	37.9(3)		
C(7)-C(8)-C(9)-N(1')	-176.2(2)		
C(7)-C(8)-C(9)-C(9A)	-2.3(3)		
N(1')-N(2')-C(3')-C(8')	0.9(3)		
N(1')-N(2')-C(3')-C(4')	-177.0(2)		
N(2')-C(3')-C(4')-C(5')	174.3(2)		
C(8')-C(3')-C(4')-C(5')	-3.7(4)		
C(3')-C(4')-C(5')-C(6')	1.0(4)		

Tabelle 11-8: Wasserstoffbrückenbindungen [Å und °]<sup>a,b</sup>.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(2')-H(02)...O(1W)	0.88(3)	2.24(3)	3.043(3)	151(3)
N(5)-H(05)...N(1)#1	0.85(4)	2.14(4)	2.965(3)	164(3)
O(1W)-H(2W)...N(1')#20	0.88(4)	2.25(4)	3.095(3)	160(3)
O(1W)-H(1W)...O(1)#30	0.86(4)	2.01(4)	2.843(3)	164(4)

Symmetrietransformationen wurden für die Generierung äquivalenter Atome benutzt:

#1  $x+1/2, -y+1, z$

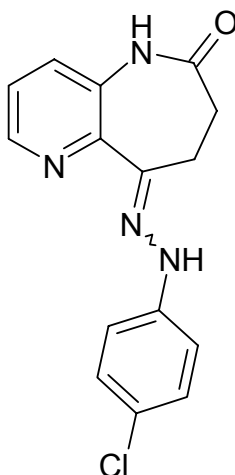
#2  $x-1/2, -y+1, z$

#3  $x-1/2, -y+2, z$

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup>Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

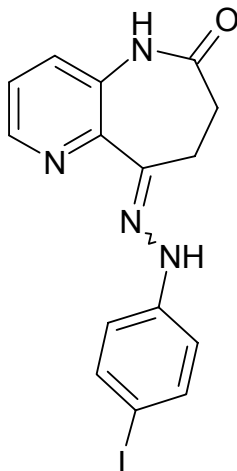


7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-chlorophenyl)hydrazon] (**45e**)

Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 160 mg (0.90 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 178 mg (1.00 mmol) (4-Chlorphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44e**) und 82 mg (1.00 mmol) Natriumacetat. Man erhält 222 mg (82 %) gelbe Kristalle.

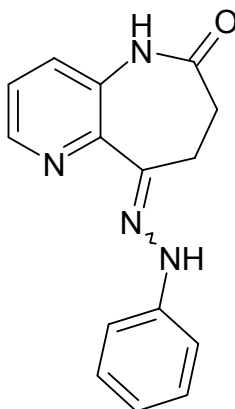
Schmp.: 220 °C; IR (KBr): 3286/3188 cm<sup>-1</sup> (NH), 3127 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2956 cm<sup>-1</sup> / 2889 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1677 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.55-2.58 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.01-3.05 (m, 2H, AA'XX', Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.17-7.26 (m, 4H, AA'BB'-System, arom. H), 7.35 (dd, 1H, 8.0/4.4 Hz, arom. H), 7.39 (dd, 1H, 8.1/1.7 Hz, arom. H), 8.40 (dd, 1H, 4.4/1.7 Hz, arom. H), 9.46 (s, 1H, NH), 9.76 (s, 1H, NH); (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O) [300.75] berechnet: C 59.91, H 4.36, N 18.63, gefunden: C 59.93, H 4.30, N 17.69.

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-iodphenyl)hydrazon] (**45f**)



Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 176 mg (1.00 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) und 351 mg (1.50 mmol) (4-Iodphenyl)hydrazin (**44f**). Man erhält 247 mg (63 %) gelbe Kristalle.

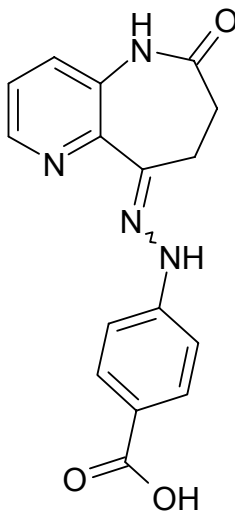
Schmp.: 205 – 205 °C; IR (KBr): 3302/3211 cm<sup>-1</sup> (NH), 2964/2900 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1691 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.55 - 2.59 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, AA'XX'-System), 3.01 - 3.04 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, AA'XX'-System), 7.02 - 7.06 (m, 2H, AA'XX'-System, arom. H), 7.37 - 7.44 (m, 2H, arom. H), 7.50 - 7.54 (m, 2H, AA'XX'-System, arom. H), 8.41 (dd, 1H, 4.5/1.7 Hz, arom. H), 9.51 (s, 1H, NH), 9.82 (s, 1H, NH); (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>4</sub>O) [392.20] berechnet: C 45.94, H 3.34, N 14.29; gefunden: C 46.47, H 3.35, N 13.25.

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-(phenylhydrazon) (**45g**)

Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 176 mg (1.00 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) und 162 mg (1.50 mmol) Phenylhydrazin (**44g**). Nach Eingießen in die Natriumacetat-Lösung wird mit 4 x 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum wird das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 85 mg (32 %) eines farblosen Feststoffs.

Schmp.: 206 °C; IR (KBr): 3291 cm<sup>-1</sup> (NH), 3060/3023 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2953/2885 cm<sup>-1</sup> (CH-aliphat.), 1676 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.54 - 2.58 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.02 - 3.06 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 6.76 - 6.81 (m, 1H, arom. H), 7.17 - 7.23 (m, 4H, arom. H), 7.36 (dd, 1H, 8.0/4.4 Hz, arom. H), 7.39 (dd, 1H, 8.0/1.7 Hz, arom. H), 8.40 (dd, 1H, 4.7/1.7 Hz, arom. H), 9.32 (s, 1H, NH), 9.76 (s, 1H, NH); (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O) [266.31] berechnet: C 67.65, N 21.04, H 5.30, gefunden: C 67.48, N 20.89, H 5.12.

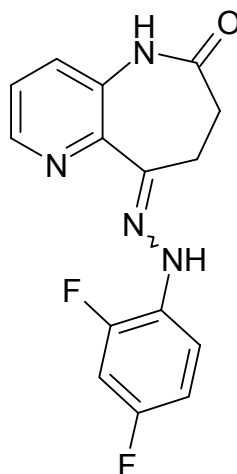
4-[2-(6-Oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9H-pyrido[3,2-b]azepino-9-yliden)hydrazono]benzoesäure (**45h**)



Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 176 mg (1.00 mmol) 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**43a**) und 228 mg (1.50 mmol) 4-Hydrazinobenzoessäure (**44h**). Man erhält 109 mg (35 %) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 280 °C; IR (KBr): 3267  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1678  $\text{cm}^{-1}$  (C=O),  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.56 - 2.59 (m, AA'XX', 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.06 - 3.10 (m, AA'XX', 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.23 (d, 2H, 8.8 Hz, arom. H), 7.36 - 7.42 (m, 2H, arom. H), 7.81 (d, 2H, 8.8 Hz, arom. H), 8.42 (dd, 1H, 4.3/1.8 Hz, arom. H), 9.76 (s, 1H, NH), 9.79 (s, 1H, NH), 12.31 (bs, 1H, COOH),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 29.9, 30.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 112.3 (2C), 123.6, 129.4, 130.8 (2C), 145.4 (tert. arom. C-Atome), 121.3, 134.4, 144.3, 147.8, 149.1 (quart. arom. C-Atome), 167.2, 172.8 (C=O); ( $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ ) [310.31] berechnet: C 61.93, H 4.55, N 18.05, gefunden: C 60.41, H 4.53, N 17.47.

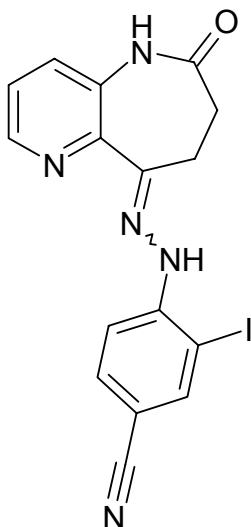
7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(2,4-difluorophenyl)hydrazon] (**45I**)



Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 176 mg (1.00 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 235 mg (1.30 mmol) (2,4-Difluorphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44I**) und 107 mg (1.30 mmol) Natriumacetat. Man erhält 203 mg (67 %) einer farblosen Substanz.

Schmp.: 255 °C; IR (KBr): 3269 cm<sup>-1</sup>/3137 cm<sup>-1</sup> (NH), 3075 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2960 cm<sup>-1</sup>/2896 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1685 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.53 – 2.56 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.13 – 3.16 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 6.97 – 7.01 (m, 1H, arom. H.), 7.20 – 7.26 (m, 1H, arom. H.), 7.36 – 7.46 (m, 3H, arom. H.), 8.41 (dd, 1H, 4.3/1.8 Hz, arom. H), 8.69 (s, 1H, NH), 9.79 (s, 1H, NH); (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O) [302.29] berechnet: C 59.60, H 4.00, N 18.53, gefunden: C 59.18, H 4.09, N 17.72.

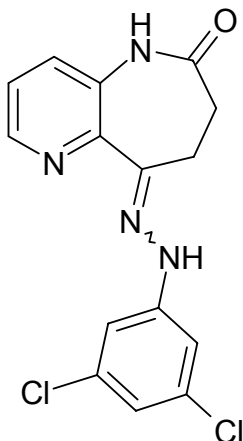
3-Iod-4-[2-(6-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9H-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril (**45m**)



Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 176 mg (1.00 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 326 mg (1.10 mmol) 4-Hydrazino-3-iodbenzonitril-Hydrochlorid (**44m**) und 90 mg (1.30 mmol) Natriumacetat. Man erhält 109 mg (26 %) gelbe Kristalle.

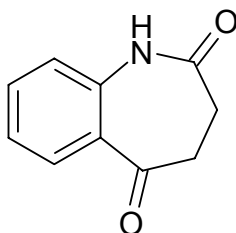
Schmp.: 266 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3436 cm<sup>-1</sup> (NH), 3065 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2976 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 2211 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1679 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO + TFA, 400 MHz): δ (ppm) = 2.74 – 2.76 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 2.99 – 3.02 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.50 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.57 (dd, 1H, 8.5/4.5 Hz, arom. H), 7.71 (dd, 1H, 8.8/2.0 Hz, arom. H), 7.77 (dd, 1H, 8.3/1.5 Hz, arom. H), 8.15 (d, 1H, 1.7 Hz, arom. H), 8.60 (dd, 1H, 4.5/1.5 Hz, arom. H), 10.09 (s, 1H, NH), 14.96 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.8, 33.0 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 112.1, 124.6, 130.5, 133.2, 142.1 (2C) (tert. arom. C-Atome), 81.4, 102.1, 118.5, 134.6, 139.7, 140.5, 148.4 (quart. arom. C-Atome), 174.2 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>5</sub>O) [417.21] berechnet: C 46.06, H 2.90, N 16.79, gefunden: C 46.31, H 3.05, N 16.02.

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(3,5-dichlorphenyl)hydrazon] (**45n**)



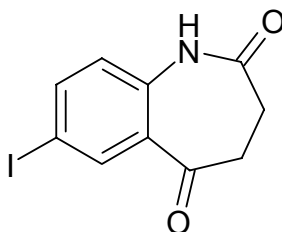
Die Synthese erfolgt nach AAV1 mit 339 mg (1.92 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 452 mg (2.11 mmol) (3,5-Dichlorphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44n**) und 169 mg (2.11 mmol) Natriumacetat. Man erhält 212 mg (33 %) eines beigen Pulvers.

Schmp.: 270 °C; IR (KBr): 3429 cm<sup>-1</sup>/ 3281 cm<sup>-1</sup> (NH), 1671 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.57-2.60 (m, AA'XX', 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.02-3.05 (m, AA'XX', 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 6.92 (t, 1H, 1.9 Hz, arom. H), 7.16 (d, 2H, 1.9 Hz, arom. H), 7.37-7.44 (m, 2H, arom. H), 8.44 (dd, 1H, 4.2/1.8 Hz, arom. H), 9.72 (s, 1H, NH), 9.81 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 29.9, 30.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 111.3, 118.2, 123.7, 129.5, 145.5 (tert. arom. C-Atome), 134.4, 134.5, 144.9, 147.5, 147.8 (quart. arom. C-Atome), 172.6 (C=O); (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O) [335.20] berechnet: C 53.75, H 3.61, N 16.71, gefunden: C 53.92, H 3.62, N 15.89.

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**)

2.05 g (8.31 mmol) 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**66a**) werden mit 0.28 ml Wasser in 22 ml DMSO unter Stickstoff bei 150 °C gerührt. Nach 1 Stunde und nach 3 Stunden werden abermals 0.28 ml Wasser zugegeben. Nach 4 Stunden Reaktionszeit lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt den Ansatz in 170 ml Wasser. Die Mischung wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, wobei sich farblose Kristalle bilden, die abgesaugt werden. Man wäscht mit Petrolether und Wasser. Ausbeute 1.16 g (80 %).

Schmp.: 186 °C (Lit.: 187 – 188 °C)<sup>190</sup>

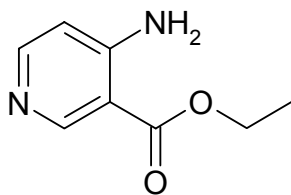
7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46b**)

2.20 g (5.9 mmol) 5-Hydroxy-7-iod-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**66b**) werden mit 0.50 ml Wasser in 59 ml DMSO unter Stickstoff bei 150 °C gerührt. Nach 1 Stunde und nach 3 Stunden werden abermals 0.28 ml Wasser zugegeben. Nach 4 Stunden Reaktionszeit lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt den Ansatz in 118 ml Wasser. Die Mischung wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, wobei sich farblose Kristalle bilden, die abgesaugt werden. Man wäscht mit Petrolether und Wasser. Ausbeute 1.24 g (70 %).



Schmp.: 214 °C (Lit.: 217 °C)<sup>190</sup>

4-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (48)



Methode A:

5.00 g (36.19 mmol) 4-Aminopyridin-3-carbonsäure (**47**) werden in 70 ml trockenem Ethanol und 6 ml konzentrierter Schwefelsäure zum Rückfluss für 90 Stunden erhitzt. Der Ansatz wird nach Ende der Reaktion im Vakuum auf ca. 20 ml eingengt. Unter Eiskühlung wird der Ansatz langsam mit 25-prozentiger Ammoniak-Lösung alkalisiert und mit 5 x 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Man erhält 5.03 g (83 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 107 °C (Lit.: 109 °C)<sup>170</sup>; IR (KBr): 3410 cm<sup>-1</sup> (NH), 3107 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2984/2964 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1694 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.28 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.68 (d, 1H, 5.9 Hz, arom. H), 7.27 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.07 (d, 1H, 5.9 Hz, arom. H), 8.68 (s, 1H, arom. H), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 14.1 (CH<sub>3</sub>), 60.1 (CH<sub>2</sub>), 110.7, 151.4, 152.2 (tert. arom. C-Atome), 106.4, 155.14 (quart. arom. C-Atome), 166.7 (C=O); (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [166.18] berechnet: C 57.82, H 6.07, N 16.86; gefunden: 57.81, H 6.07, N 16.79.

Methode B:

829 mg (6.00 mmol) 4-Aminopyridin-3-carbonsäure (**47**) werden bei Raumtemperatur in 25 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 1.69 g (12.02 mmol) Kaliumcarbonat wird für 30 Minuten gerührt. Anschließend werden 963 mg (6.00 mmol) Ethyliodid in 17 ml DMF zugetropft und es wird für weitere 3 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Reaktion gießt man auf 120 ml Eiswasser und extrahiert den Ansatz mit 6 x 40 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 2 x 20 ml 10-prozentiger Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, anschließend über

Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Man erhält 213 mg (21 %) farblose Kristalle.

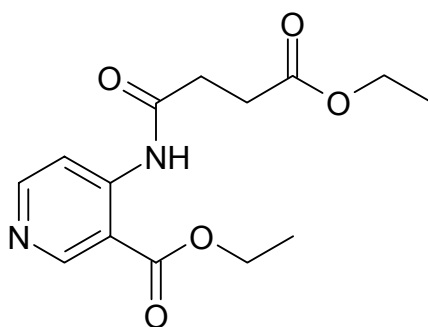
Schmp.: 110 °C (Lit.: 109 °C)<sup>170</sup>. Die analytischen Daten stimmen mit denen der nach Methode A erhaltenen Verbindung überein.

Methode C:

138 mg (1.00 mmol) 4-Aminopyridin-3-carbonsäure (**47**) werden in 2.0 ml trockenem Ethanol und 1.12 ml konzentrierter Schwefelsäure in einem Synthesemikrowellengerät erhitzt. Folgende Parameter wurden gewählt: ramp time 2:00 Minuten, Reaktionstemperatur 150 °C, Reaktionszeit 30 Minuten. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf 5 ml Eiswasser gegossen, mit 25-prozentiger Ammoniak-Lösung alkalisiert und mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisation aus Petrolether/Ethanol 9:1 erhält man 50 mg (30 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 107 °C (Lit.: 109 °C)<sup>170</sup>. Die analytischen Daten stimmen mit denen der nach Methode A erhaltenen Verbindung überein.

4-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (**49**)

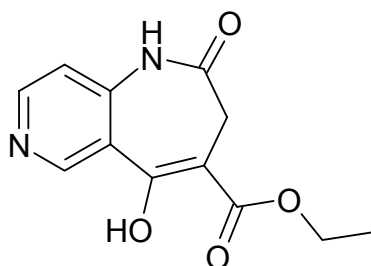


6.08 g (60.3 mmol) Calciumcarbonat werden mit 5.01 g (30.15 mmol) 4-Aminopyridin-3-carbonsäureethylester (**48**) in 75 ml trockenem Toluol im Eiswasserbad gerührt. Zu dieser Suspension tropft man eine Lösung aus 6.19 g (37.7 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 75 ml trockenem Toluol.

Anschließend wird 7 Stunden bis zur Umsetzung zum Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird heiß filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Das entstehende gelbe Öl wird in Ethanol erwärmt. Beim Abkühlen bilden sich 5.95 g (67 %) farblose Kristalle, die abgesaugt werden.

Schmp.: 94 - 95 °C, IR (KBr): 3249 cm<sup>-1</sup> (NH), 2989/2936/2909 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1738/1721/1681 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.18 (t, 3H, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, 3H, 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 2.61 - 2.64 (m, 2H, AA'XX' – System, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.73 – 2.76 (m, 2H, AA'XX' – System, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.06 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.37 (q, 2H, 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 8.29 (d, 1H, 5.8 Hz, arom. H), 8.62 (d, 1H, 5.8 Hz, arom. H), 8.99 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 13.84, 14.00 (CH<sub>3</sub>), 28.36, 31.87 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 59.99, 61.56 (O-CH<sub>2</sub>), 113.6, 151.7, 154.1 (tert. arom. C-Atome), 112.3, 145.9 (quart. arom. C-Atome), 166.3, 171.1, 171.9 (C=O), (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) [294.31] berechnet: C 57.14, H 6.16, N 9.52, gefunden: C 57.27, H 6.41, N 9.62.

#### 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-pyrido[4,3-b]azepin-4-carbonsäureethylester (50)

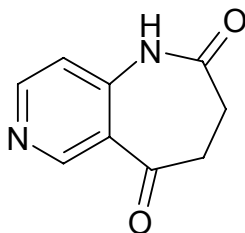


2.95 g (73.6 mmol) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit) werden unter Stickstoffbegasung dreimal mit 7 ml trockenem Toluol gewaschen und anschließend in 7 ml trockenem Toluol suspendiert. Dazu wird eine Lösung aus 4.30 g (14.61 mmol) 4-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]pyridin-3-carbonsäureethylester (**49**) in 55 ml trockenem Toluol und 7 ml trockenem DMF unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Silikonölbad in die vorgelegte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bis zur vollständigen Umsetzung bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen wird mit 4.3 ml Eisessig vorsichtig neutralisiert und anschließend werden vorsichtig 45 ml Wasser

zugetropft. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 2.47 g (68 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 199 °C, IR (KBr): 3148 (NH), 3046  $\text{cm}^{-1}$  (CH-arom.), 2958  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1701/1661  $\text{cm}^{-1}$  (C=O),  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.30 (t, 3H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.03 (s, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 4.30 (q, 2H, 7.1 Hz, O- $\text{CH}_2$ ), 7.12 (d, 1H, 5.6 Hz, arom. H), 8.54 (d, 1H, 5.6 Hz, arom. H), 8.90 (s, 1H, arom. H), 10.77 (s, 1H, NH), 12.47 (s, 1H, OH),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.0 ( $\text{CH}_3$ ), 30.9 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 61.3 (O- $\text{CH}_2$ ), 115.0, 150.0, 151.3 (tert. arom. C-Atome), 96.1, 120.6, 144.3, 165.0 (quart. arom. C-Atome), 170.0, 171.7 (C=O); ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ ) [248.24] berechnet: C 58.06 H 4.87 N 11.28, gefunden: C 58.02 H 4.84 N 11.16.

### 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**)

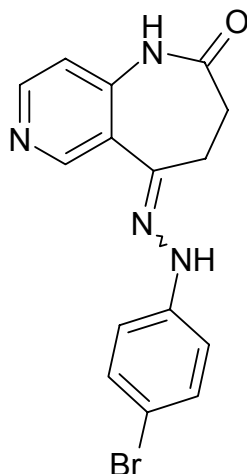


305 mg (1.23 mmol) 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-4-carbonsäureethylester (**50**) werden in 40 ml DMF bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Alle 30 Minuten gibt man 4 Tropfen Wasser hinzu. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 184 mg (85 %) beigefarbene Kristalle.

Schmp.: 213 – 215 °C, IR (KBr): 3132  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 2958  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1714  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1679  $\text{cm}^{-1}$  (C=O),  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.75 - 2.78 (m, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 2.91 - 2.95 (m, 2H, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 7.12 (d, 1H, 5.6 Hz, arom. H), 8.52 (d, 1H, 5.5 Hz, arom. H), 8.90 (s, 1H, arom. H), 10.53 (s, 1H, NH),  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 29.1, 27.1 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 114.9, 152.1, 153.4 (tert. arom. C-Atome), 120.4, 145.6 (quart. arom. C-Atome), 173.6, 197.3 (C=O);

El/HRMS ( $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ ) [176.18] ( $m/z$ ) [ $M^+$ ] berechnet: 176.05856, gefunden: 176.05784; ( $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2 \times 0.5 \text{ H}_2\text{O}$ ) [185.18] berechnet: C 58.37 H 4.90 N 15.13, gefunden: C 58.25 H 5.01 N 14.86.

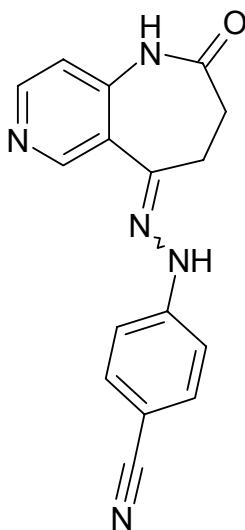
3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion-5-[(4-bromphenyl)hydrazon] (**52a**)



Die Synthese erfolgt nach AAV1 aus 141 mg (0.8 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**), 200 mg (0.9 mmol) (4-Bromphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**44a**) und 74 mg (0.9) Natriumacetat. Man erhält 69 mg (25 %) gelbe Kristalle.

Schmp.: 220 °C (unter Zersetzung, ab 159 °C Dunkelfärbung), IR (KBr): 3278  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3101  $\text{cm}^{-1}$  (CH-arom.), 2959/2929/2860  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1673  $\text{cm}^{-1}$  (C=O),  $^1\text{H}$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.60 - 2.63 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 2.98 - 3.01 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin- $\text{CH}_2$ ), 6.97 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 7.15 - 7.19 (m, 2H, arom. H), 7.36 - 7.40 (m, 2H, arom. H), 8.38 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 8.76 (s, 1H, arom. H), 9.47 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, NH),  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 28.9, 31.0 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 115.0 (2C), 115.2, 131.6 (2C), 149.2, 150.1 (tert. arom. C-Atome), 110.6, 125.5, 141.4, 143.6, 144.9 (quart. arom. C-Atome), 173.1 (C=O), ( $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O} \times \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) [391.27] berechnet: C 52.19 H 4.89 N 14.32, gefunden: C 51.96 H 5.01 N 13.

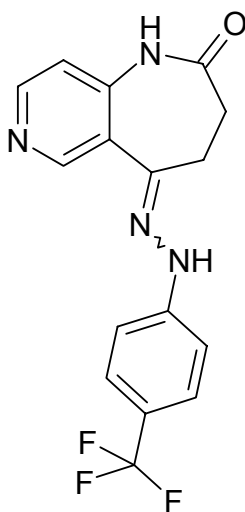
4-[2-(2-Oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5H-pyrido[4,3-*b*]azepin-5-yliden)hydrazino]benzonitril  
**(52c)**



Die Synthese erfolgt nach AAV1 aus 336 mg (1.9 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**), 356 mg (2.1 mmol) 4-Hydrazinobenzonitril-Hydrochlorid (**44c**) und 171 mg (2.1) Natriumacetat. Man erhält 260 mg (47 %) braune Kristalle.

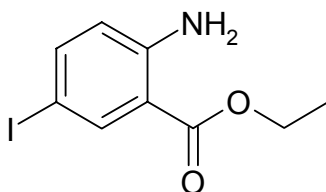
Schmp.: 274 °C; IR (KBr): 3258 cm<sup>-1</sup> (NH), 3058 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 2212 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1677 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.62 – 2.65 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.03 – 3.06 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 6.98 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 7.30 – 7.33 (m, 2H, AA'XX'-System, arom. H), 7.62 – 7.66 (m, 2H, AA'XX'-System, arom. H), 8.41 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 8.77 (s, 1H, arom. H), 9.92 (s, 1H, NH), 10.17 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 29.1, 31.0 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 113.2 (2C), 115.3, 133.5 (2C), 149.7, 150.3 (tert. arom. C-Atome), 100.3, 119.9, 125.2, 144.0, 144.2, 148.9 (quart. arom. C-Atome), 173.0 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O x H<sub>2</sub>O) [307.35] berechnet: C 62.13, H 4.89, N 22.64, gefunden: C 62.36, H 4.69, N 22.27.

3,4-Dihydro-1*H*-pyrido-[4,3-*b*]azepin-2,5-dion-5-{[4-(trifluormethyl)phenyl]hydrazon}  
**(52d)**



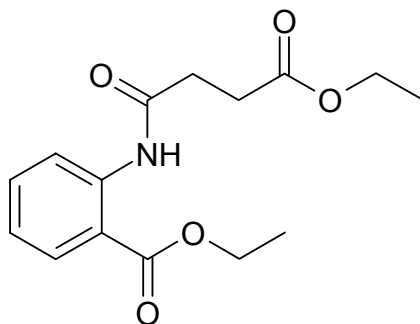
Die Synthese erfolgt nach AAV1 aus 176 mg (1.0 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]azepin-2,5-dion (**51**) und 194 mg (1.1 mmol) [4-(Trifluormethyl)phenyl]hydrazin (**44d**). Man erhält 74 mg (22 %) farblose, feine Kristalle.

Schmp.: 248 - 249 °C; IR (KBr): 3278 cm<sup>-1</sup> (NH), 2979/2924 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1674 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.62 – 2.65 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.02 – 3.06 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin-CH<sub>2</sub>), 6.98 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 7.35 (d, 1H, 8.5 Hz, AA'XX'-System, arom. H), 7.56 (d, 1H, 8.7 Hz, AA'XX'-System, arom. H), 8.40 (d, 1H, 5.4 Hz, arom. H), 8.78 (s, 1H, arom. H), 9.77 (s, 1H, NH), 10.16 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 29.1, 31.0 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 112.8 (2C), 115.3, 126.3 (q, <sup>3</sup>J = 4 Hz, C-C-CF<sub>3</sub>) (2C), 149.5, 150.2 (tert. arom. C-Atome), 119.3 (q, <sup>2</sup>J = 32 Hz, C-CF<sub>3</sub>), 124.9 (q, <sup>1</sup>J = 273 Hz, CF<sub>3</sub>), 125.4, 143.0, 143.8, 148.6 (quart. arom. C-Atome, 173.1 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O x C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) [380.37] berechnet: C 56.84, H 5.03, N 14.73, gefunden: C 56.40, H 4.96, N 14.30.

5-Iodanthranilsäureethylester (**64b**)

6.55 g (25.0 mmol) 5-Iodanthranilsäure (**63b**) werden bei Raumtemperatur in 40 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 6.9 g (50.0 mmol) Kaliumcarbonat wird für 30 Minuten gerührt. Anschließend werden 4.29 g (27.5 mmol) Ethyliodid in 10 ml DMF zugetropft und es wird für weitere 60 Minuten gerührt. Nach Abschluss der Reaktion gießt man auf 200 ml Eiswasser. Der Niederschlag wird abgesaugt und aus Petrolether umkristallisiert. Man erhält 4.52 g (62 %) farblose Kristalle

Schmp.: 69 °C (Lit.: 69 - 70 °C)<sup>221</sup>

2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]benzoesäureethylester (**65a**)

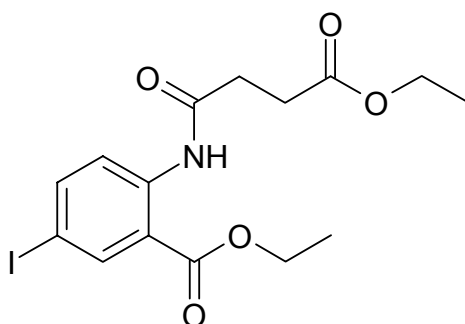
2.47 g (14.97 mmol) Anthranilsäureethylester werden in einer Mischung aus 1.7 ml Pyridin und 6.5 ml getrocknetem Toluol gerührt. Bei einer Temperatur zwischen 0 - 5 °C wird eine Lösung von 2.98 g (18.13 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 4 ml getrocknetem Toluol hinzugegeben. Nach anschließendem zweistündigem Erhitzen zum Rückfluss wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Ansatz wird mit 5 ml Wasser versetzt und in den Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und verworfen; die organische Phase wird nacheinander mit 10-



prozentiger Salzsäure, 10-prozentiger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Im Vakuum wird zur Trockne eingengt. Erhalten wird ein Feststoff, der aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält 3.52 g (80 %) farblose Kristalle.

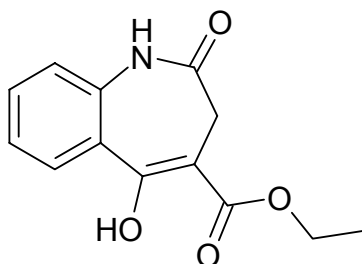
Schmp. 60 °C (Lit.: 60 °C)<sup>222</sup>.

2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-iodbenzoesäureethylester (**65b**)



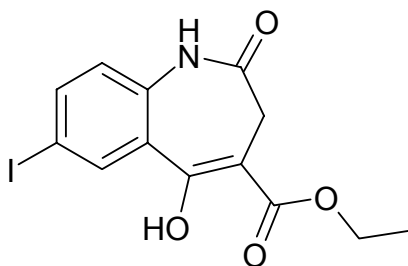
4.377 g (15.0 mmol) 5-Iodanthranilsäureethylester (**64b**) werden in einer Mischung aus 1.8 ml Pyridin und 6.5 ml getrocknetem Toluol gerührt. Bei einer Temperatur zwischen 0 - 5 °C wird eine Lösung von 2.96 g (18.0 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 4.5 ml getrocknetem Toluol hinzugegeben. Nach anschließendem zweistündigem Erhitzen zum Rückfluss wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Ansatz wird mit 5 ml Wasser versetzt und in den Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und verworfen; die organische Phase wird nacheinander mit 10-prozentiger Salzsäure, 10-prozentiger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Im Vakuum wird zur Trockne eingengt. Erhalten wird ein Feststoff, der aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält 3.33 g (59 %) farblose Kristalle.

Schmp. 103 °C (Lit.: 106 °C)<sup>190</sup>.

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**66a**)

2.37 g (59.32 mmol) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit) werden unter Stickstoffbegasung dreimal mit 7 ml trockenem Toluol gewaschen und anschließend in 10 ml trockenem Toluol suspendiert. Dazu wird eine Lösung aus 3.49 g (11.86 mmol) 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]benzoesäureethylester (**65a**) in 36 ml trockenem Toluol und 5 ml trockenem DMF unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Silikonölbad in die vorgelegte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bis zur vollständigen Umsetzung bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen wird mit 3.6 ml Eisessig vorsichtig neutralisiert und anschließend werden vorsichtig 36 ml Wasser zugetropft. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 2.20 g (75 %) farblose Kristalle.

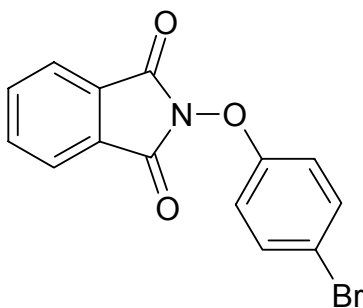
Schmp.: 210 °C (Lit. 210 – 213 °C)<sup>160</sup>.

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**66a**)

1.88 g (47.06 mmol) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit) werden unter Stickstoffbegasung dreimal mit 4 ml trockenem Toluol gewaschen und anschließend in 4 ml trockenem Toluol suspendiert. Dazu wird eine Lösung aus 4.19 g (10.0 mmol) 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-iodbenzoesäureethylester (**65b**) in 20 ml trockenem Toluol und 2 ml trockenem DMF unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Silikonölbad in die vorgelegte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bis zur vollständigen Umsetzung bei 70 - 80 °C gerührt. Nach Abkühlen wird mit 2.0 ml Eisessig vorsichtig neutralisiert und anschließend werden vorsichtig 40 ml Wasser zugetropft. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 2.21 g (59 %) farblose Kristalle.

Schmp.: 247 °C (Lit. 254 °C)<sup>190</sup>.

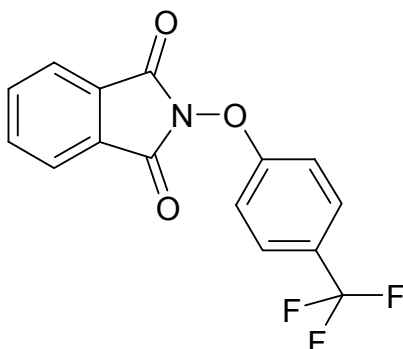
N-(4-Bromphenoxy)phthalimid (**70a**)



In zwei 25 ml Zweihalskolben werden jeweils ~375 mg aktiviertes 4 Å Molsieb, 245 mg (1.50 mmol) *N*-Hydroxyphthalimid (**68**), 149 mg (1.50 mmol) Kupfer(I)-chlorid und 603 mg (3.0 mmol) 4-Bromphenylboronsäure (**69a**) eingewogen. Dazu gibt man 7.5 ml trockenes 1,2-Dichlorethan und 135 µl (1.65 mmol) trockenes Pyridin. Den Ansatz lässt man bei Raumtemperatur bei leicht geöffnetem Kolben für 60 Stunden rühren. Der Ansatz wird auf 8 g Kieselgel adsorbiert und über Säulenchromatographie (55 g Kieselgel, Elutionsmittel: *n*-Hexan/Dichlormethan 4:6) gereinigt. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingengt. Man erhält 617 mg (65%) feine, farblose Kristalle (Lit.: 73%).<sup>175</sup>

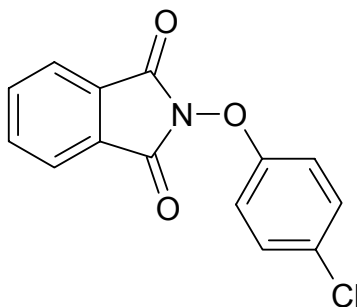
Schmp.: 146 – 147 °C (Lit.: 143 – 145 °C).<sup>175</sup>

*N*-[4-(Trifluormethyl)phenoxy]phthalimid (**70d**)



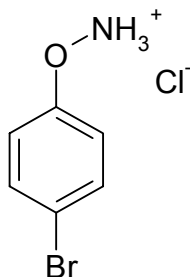
In zwei 25 ml Zweihalskolben werden jeweils ~375 mg aktiviertes 4 Å Molsieb, 245 mg (1.50 mmol) *N*-Hydroxyphthalimid (**68**), 149 mg (1.50 mmol) Kupfer(I)-chlorid und 570 mg (3.0 mmol) 4-(Trifluormethyl)phenylboronsäure (**69d**) eingewogen. Dazu gibt man 7.5 ml trockenes 1,2-Dichlorethan und 135 µl (1.65 mmol) trockenes Pyridin. Den Ansatz lässt man bei Raumtemperatur bei leicht geöffnetem Kolben für 80 Stunden rühren. Der Ansatz wird auf 4 g Kieselgel adsorbiert und über Säulenchromatographie (45 g Kieselgel, Elutionsmittel: Ethylacetat/*n*-Hexan 3:7) gereinigt. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingengt. Man erhält 607 mg (66 %) feine, farblose Kristalle (Lit.: 65%).<sup>175</sup>

Schmp.: 119 – 121 °C (Lit.: 120 – 122 °C).<sup>175</sup>

*N*-(4-Chlorphenoxy)phthalimid (**70e**)

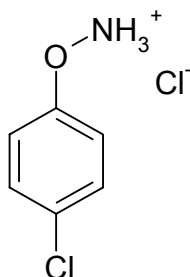
In drei 25 ml Zweihalskolben werden jeweils ~250 mg aktiviertes 4 Å Molsieb, 163 mg (1.00 mmol) *N*-Hydroxyphthalimid (**68**), 99 mg (1.00 mmol) Kupfer(I)-chlorid und 312 mg (2.0 mmol) 4-Chlorphenylboronsäure (**69e**) eingewogen. Dazu gibt man 5 ml trockenes 1,2-Dichlorethan und 90 µl (1.1 mmol) trockenes Pyridin. Den Ansatz lässt man bei Raumtemperatur bei leicht geöffnetem Kolben für 48 Stunden rühren. Der Ansatz wird auf 8 g Kieselgel adsorbiert und über Säulenchromatographie (55 g Kieselgel, Elutionsmittel: *n*-Hexan/Dichlormethan 4:6) gereinigt. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingeengt. Man erhält 540 mg (66 %) feine, farblose Kristalle.

Schmp.: 142 °C; IR (KBr): 1787/1733 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.32 – 7.36 (m, 2H, AA'BB'-System, arom. H), 7.41 – 7.45 (m, 2H, AA'BB'-System, arom. H), 7.92 – 7.97 (m, 4H, arom. H); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 115.2, 123.7, 129.6, 135.1 (tert. arom. C-Atome), 127.8, 128.7, 157.4 (quart. arom. C-Atome, 162.7 (C=O); (C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>3</sub>) [273.86] berechnet: C 61.44, H 2.95, N 5.12, gefunden: C 61.16, H 2.92, N 4.92.

O-(4-Bromphenyl)hydroxylamin-Hydrochlorid (71a)

617 mg (1.94 mmol) *N*-(4-Bromphenoxy)phthalimid werden in 20 ml  $\text{CHCl}_3$  und 2 ml Methanol gelöst. Nach Zusatz von 285  $\mu\text{l}$  (5.82 mmol) Hydrazin-Hydrat wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird an 4.5 g Kieselgel adsorbiert und über Säulenchromatographie (35 g Kieselgel, Elutionsmittel: Ethylacetat/*n*-Hexan 3:7) gereinigt. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene gelbliche Öl wird mit 5 ml Ethanol und mit 166  $\mu\text{l}$  konzentrierter Salzsäure versetzt und anschließend einrotiert. Man erhält 300 mg (69%) braun-violette Kristalle.

Das erhaltene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum entspricht den Angaben der Literatur.<sup>175</sup>

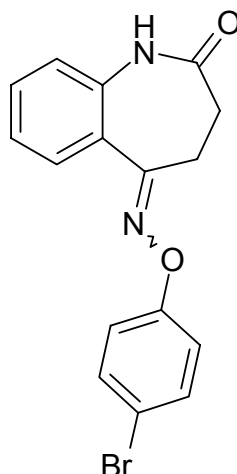
O-(4-Chlorphenyl)hydroxylamin-Hydrochlorid (71e)

527 mg (1.92 mmol) *N*-(4-Chlorphenoxy)phthalimid werden in 18 ml  $\text{CHCl}_3$  und 2 ml Methanol gelöst. Nach Zusatz von 281  $\mu\text{l}$  (5.75 mmol) Hydrazin-Hydrat wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird an 4.0 g Kieselgel adsorbiert und über Säulenchromatographie (35 g Kieselgel, Elutionsmittel: Ethylacetat/*n*-Hexan 3:7) gereinigt. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene gelbliche Öl wird mit 5 ml Ethanol und mit 163  $\mu\text{l}$

konzentrierter Salzsäure versetzt und anschließend einrotiert. Man erhält 310 mg (90 %) braun-violette Kristalle.

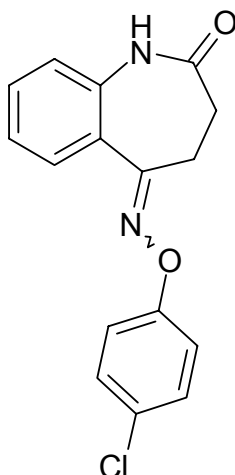
Schmp.: 123 °C (Lit.: 122 – 123 °C).<sup>176</sup>

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-[O-(4-bromphenyl)oxim] (**72a**)



Die Synthese erfolgt nach AAV6 aus 87.6 mg (0.5 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**), 123 mg (0.55 mmol) O-(4-Bromphenyl)hydroxylamin-Hydrochlorid (**71a**) und 45 mg (0.55 mmol) Natriumacetat. Man erhält 146 mg (86 %) ockerfarbene Nadeln.

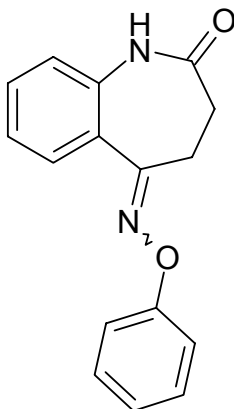
Schmp.: 170 °C; IR (KBr): 3204 cm<sup>-1</sup> (NH), 3066 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2977/2916 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1672 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.51 – 2.55 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, Teil eines AA'XX'-Systems, Signal wird teilweise durch das d<sub>6</sub>-DMSO-Signal überlagert), 3.25 – 3.29 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.10 (dd, 1H, 8.0/1.0 Hz, arom. H), 7.19 – 7.23 (m, 3H, arom. H), 7.48 (dd, 1H, 7.7/1.6 Hz, arom. H), 7.50 – 7.54 (m, 2H, arom. H), 7.64 (dd, 1H, 7.7/1.5 Hz, arom. H), 9.88 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 29.3, 30.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 116.9 (2C), 122.2, 124.4, 129.8, 131.2, 132.2 (2C) (tert. arom. C-Atome), 114.0, 126.4, 138.3, 158.0, 162.4 (quart. arom. C-Atome), 172.7 (C=O), (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [345.20] berechnet: C 55.67, H 3.80, N 8.12, gefunden: C 55.53, H 3.90, N 7.92.

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-[O-(4-chlorphenyl)oxim] (**72e**)

Die Synthese erfolgt nach AAV6 aus 87.6 mg (0.5 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**), 99 mg (0.55 mmol) O-(4-Chlorphenyl)hydroxylamin-Hydrochlorid (**71e**) und 45 mg (0.55 mmol) Natriumacetat. Man erhält 79 mg (53 %) ockerfarbene Nadeln.

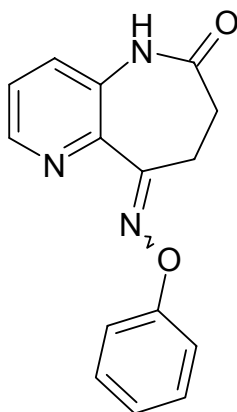
Schmp.: 169 °C; IR (KBr): 3204 cm<sup>-1</sup> (NH), 3073 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2917 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1673 (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.52 – 2.55 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, Teil eines AA'XX'-Systems, Signal wird teilweise durch den d<sub>6</sub>-DMSO-Peak verdeckt), 3.26 – 3.29 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.21 (ddd, 1H, 7.6/7.5/1.2 Hz, arom. H), 7.24 – 7.28 (m, 2H, Teil eines AA'XX'-Systems, arom.H), 7.38 – 7.42 (m, 2H, Teil eines AA'XX'-Systems, arom.H), 7.49 (ddd, 1H, 7.8/7.6/1.6 Hz, arom. H), 7.64 (dd, 1H, 7.7/1.5 Hz, arom. H), 9.89 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 29.3, 30.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 116.4 (2C), 122.2, 124.4, 129.3 (2C), 129.8, 131.2 (tert. arom. C-Atome), 126.2, 126.4, 138.3, 157.6, 162.3 (quart. arom. C-Atome), 172.7 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [300.75] berechnet: C 63.90, H 4.36, N 9.31, gefunden: C 63.41, H 4.10, N 9.14.



3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-(*O*-phenyloxim) (**72g**)

Die Synthese erfolgt nach AAV6 aus 175 mg (1.0 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46a**), 189 mg (1.30 mmol) *O*-Phenylhydroxylamin-Hydrochlorid (**71g**) und 106 mg (1.30 mmol) Natriumacetat. Man erhält 145 mg (55 %) braune Nadeln.

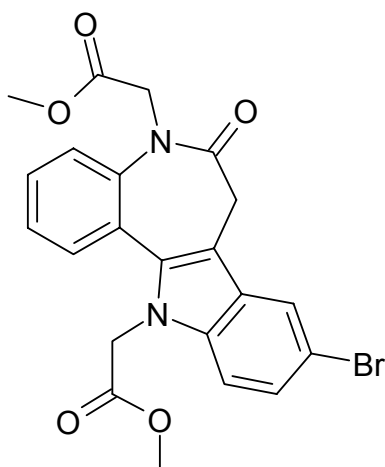
Schmp.: 149 – 150 °C; IR (KBr): 3180 cm<sup>-1</sup> (NH), 3065 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2963/2922 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1681 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.52-2.55 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, Teil eines AA'XX'-Systems), 3.26-3.29 (m, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.04-7.11 (m, 2H, arom. H), 7.19-7.24 (m, 3H, arom. H), 7.34-7.38 (m, 2H, arom. H), 7.48 ("dt", 1H, 7.7/7.6/1.5 Hz, arom. H), 7.64 (dd, 1H, 7.7/1.4 Hz, arom. H), 9.87 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 29.3, 30.6 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 114.7 (2C), 122.2, 122.6, 124.4, 129.4 (2C), 129.8, 131.1 (tert. arom. C-Atome), 126.7, 138.3, 158.8, 161.7 (quart. arom. C-Atome), 172.8 (C=O); (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [266.30] berechnet: C 72.17, H 5.30, N 10.52, gefunden: C 71.84, H 5.31, N 10.13.

7,8-Dihydro-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-(*O*-phenyloxim) (**73g**)

Die Synthese erfolgt nach AAV6 mit 176 mg (1.0 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**), 189 mg (1.30 mmol) *O*-Phenylhydroxylamin-Hydrochlorid (**71g**) und 106 mg (1.30 mmol) Natriumacetat. Man erhält 149 mg (56 %) rotbraune Nadeln.

Schmp.: 182 °C; IR (KBr): 3065 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2957/2894 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1691 cm<sup>-1</sup> (C=O), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.56 – 2.59 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.33 – 3.36 (m, 2H, AA'XX'-System, Azepin-CH<sub>2</sub>, Teil des Signals wird durch den H<sub>2</sub>O-Peak überdeckt), 7.05 – 7.09 (m, 1H, arom. H), 7.20 – 7.23 (m, 2H, arom. H), 7.33 – 7.38 (m, 2H, arom. H), 7.49 – 7.54 (m, 2H, arom. H), 8.45 (dd, 1H, 4.0/1.2 Hz, arom. H), 9.94 (s, 1H, NH), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 29.2, 30.4 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 114.8, 122.6, 125.4, 129.4, 129.9, 145.5 (tert. arom. C-Atome), 135.6, 144.5, 158.7, 160.5 (quart. arom. C-Atome), 172.6 (C=O); (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) [267.29] berechnet: C 67.41, H 4.90, N 15.72, gefunden: 63.41, H 4.10, N 9.14.

2-{9-Brom-12-[2-methoxy-2-oxo)ethyl]-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-5-yl}-essigsäuremethylester (85)



Methode A:

Zu einer Lösung von 163 mg (0.5 mmol) Kenpaullon (**1a**) in 60 ml Aceton werden unter Kühlung im Eiswasserbad 28 mg (0.5 mmol) gemörserte Kaliumhydroxid-Plätzchen gegeben und 1 Stunde gerührt. Nach Zugabe von 766 mg (5.0 mmol) Bromessigsäuremethylester lässt man 3 Tage bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird der Ansatz auf 60 ml Wasser gegossen. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt mit Wasser gewaschen und aus Ethanol/Toluol 1:1 umkristallisiert. Man erhält 90 mg (38 %) farblose Kristalle.

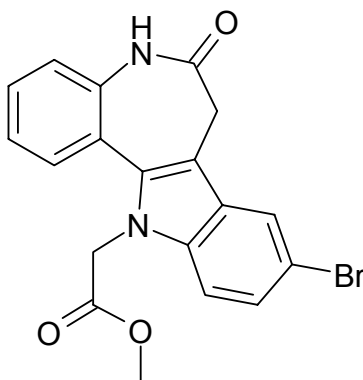
Schmp.: 182 – 184 °C; IR (KBr): 3069 cm<sup>-1</sup> (CH-aromat.), 2952 cm<sup>-1</sup> (CH-aliphat.), 1747 cm<sup>-1</sup> (C=O Ester), 1677 cm<sup>-1</sup> (C=O Lactam), <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.04 (d, 1H, 14.0 Hz, Azepin-CH<sub>2</sub>), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.96 (d, 1H, 14.0 Hz, Azepin-CH<sub>2</sub>), 4.36 (d, 1H, 17.4 Hz, Methylen-CH<sub>2</sub>), 4.43 (d, 1H, 17.4 Hz, Methylen-CH<sub>2</sub>), 5.13 (d, 1H, 18.3 Hz, Methylen-CH<sub>2</sub>), 5.23 (d, 1H, 18.3 Hz, Methylen-CH<sub>2</sub>), 7.36-7.59 (m, 6H, arom. H), 8.01 (d, 1H, 1.8 Hz, arom. H), <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 30.9 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 46.1, 51.7 (Ester-CH<sub>2</sub>), 51.9, 52.4 (OCH<sub>3</sub>), 112.6, 120.8, 124.4, 125.2, 125.6, 127.5, 129.1 (tert. arom. C-Atome), 111.2, 112.8, 123.6, 127.0, 134.9, 137.4, 140.5 (quart. arom. C-Atome), 169.2, 169.7, 170.8 (C=O); (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) [471.31] berechnet: C 56.07, H 4.06, N 5.94, gefunden: C 56.09, H 3.98, N 5.89.

## Methode B:

82 mg (0.25 mmol) Kenpaullon (**1a**) werden mit 163 mg (0.5 mmol) Cäsiumcarbonat und 76,6 mg (0.5 mmol) Bromessigsäuremethylester in 5 ml Acetonitril suspendiert und zum Reflux erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und filtriert den Ansatz. Der Filterkuchen wird mit 8 ml Ethylacetat nachgewaschen. Das Filtrat wird mit 5 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließend mit 3 x 5 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Man erhält ein gelbes Öl, das langsam zu einem farblosen Feststoff kristallisiert. Ausbeute: 43 mg (36 %) farblose Kristalle.

Die Daten des erhaltenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums waren in Übereinstimmung mit denen, die nach Methode A gewonnen wurden.

(9-Brom-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-12-yl)-  
essigsäuremethylester (**86**)



## Methode A:

Zu einer Lösung von 163 mg (0.5 mmol) Kenpaullon (**1a**) in 60 ml Aceton werden unter Kühlung im Eiswasserbad 28 mg (0.5 mmol) gemörserte Kaliumhydroxid-Plätzchen gegeben und 1 Stunde gerührt. Nach Zugabe von 383 mg (2.5 mmol) Bromessigsäuremethylester lässt man für 3 Tage bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird der Ansatz auf 60 ml Wasser gegossen. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol/Toluol 1:1 umkristallisiert. Man erhält 42 mg (21 %) farblose Kristalle (Lit.: 27 %) <sup>190</sup>.

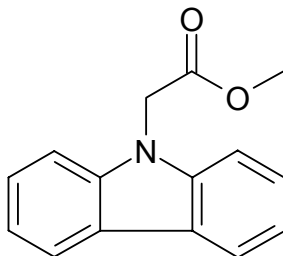
Die Daten des erhaltenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums waren in Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Daten.<sup>190</sup>

Methode B:

32 mg (0.1 mmol) Kenpauillon (**1a**) werden mit 163 mg (0.5 mmol) Cäsiumcarbonat in destilliertem Aceton für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 15 mg (0.1 mmol) Bromessigsäuremethylester lässt man für 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird der Ansatz auf 5 ml Wasser gegossen. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt mit Wasser gewaschen und aus Ethanol/Toluol 1:1 umkristallisiert. Man erhält 9 mg (23 %) farblose Kristalle.

Die Daten des erhaltenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums waren in Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Daten.<sup>190</sup>

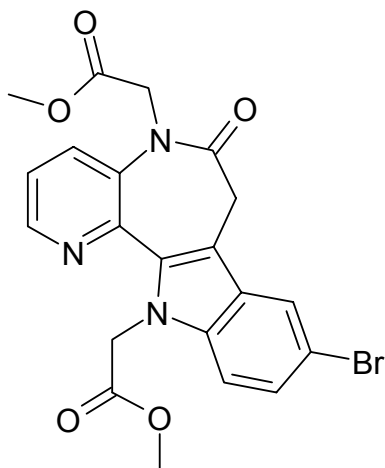
9H-Carbazol-9-yl-essigsäuremethylester (**88**)



84 mg (0.5 mmol) 9H-Carbazol werden mit 325 mg (1.0 mmol) Cäsiumcarbonat in 5 ml Acetonitril suspendiert. Zu dieser Suspension werden 135 mg (1.0 mmol) Bromessigsäuremethylester gegeben und der Ansatz zum Reflux erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und filtriert den Ansatz. Der Filterkuchen wird mit 5 ml Ethylacetat nachgewaschen. Das Filtrat wird mit 5 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließend mit 3 x 5 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Man erhält 78 mg (65 %) einer weißen Substanz.

Die Daten des erhaltenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums waren in Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Daten.<sup>223</sup>

2-{9-Brom-12-[2-methoxy-2-oxo]ethyl]-6-oxo-6,7-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-b]indol-5-yl}-5*H*-essigsäuremethylester (**89**)

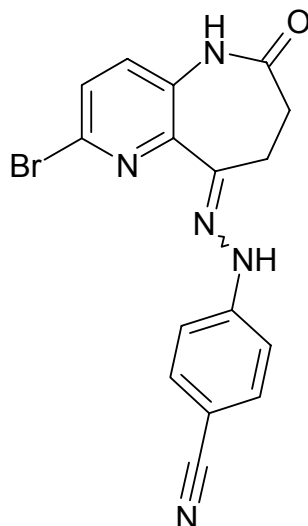


34 mg (0.1 mmol) 1-Azakenpaullon (**2a**) werden mit 33 mg (0.1 mmol) Cäsiumcarbonat in destilliertem Aceton für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 15 mg (0.1 mmol) Bromessigsäuremethylester lässt man für 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Anschließend werden weitere 213 mg (1.4 mmol) Bromessigsäuremethylester zugegeben und man lässt für weitere 48 Stunden rühren. Danach wird der Ansatz auf 5 ml Wasser gegossen. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt. Man erhält 26 mg (55 %) einer farblosen Substanz.

Schmp.: 211 – 213 °C; IR (KBr): 3077  $\text{cm}^{-1}$  (CH-arom.), 2949  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliphat.), 1757  $\text{cm}^{-1}$  / 1733  $\text{cm}^{-1}$  / 1670  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.19 (br. s, 1H, Azepin-CH), 3.64 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.66 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.12 (br. s, 1H, Azepin-CH), 4.42 - 4.44 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.22 (br. s, 1H, CH, 2-H), 5.57 (br. s, 1H, CH, 2-H), 7.42 (dd, 1H, 8.8/1.9 Hz, arom. H.), 7.51 (dd, 1H, 8.4/4.5 Hz, arom. H), 7.62 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 7.94 (dd, 1H, 8.4/1.3 Hz, arom. H), 8.08 (d, 1H, 1.8 Hz, arom. H), 8.53 (dd, 1H, 4.5/1.3 Hz, arom. H),  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 30.9 (Azepin- $\text{CH}_2$ ), 46.2, 51.4 (N- $\text{CH}_2$ ), 51.9, 52.0 ( $\text{OCH}_3$ ), 112.7, 121.2, 122.9, 126.5, 132.1, 145.4 (tert. arom. C-Atome), 112.5, 112.6, 132.9, 137.0, 137.5, 142.3

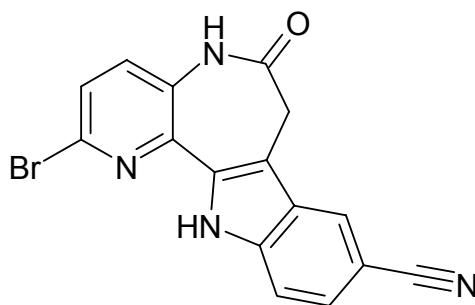
(quart. arom. C-Atome), 169.2, 169.6, 170.2 (C=O); EI/HRMS ( $C_{21}H_{18}BrN_3O_5$ ) [472.30] (m/z) [ $M^+$ ] berechnet: 471.04297, gefunden: 471.04133.

4-[2-(2-Brom-6-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9H-pyrido[3,2-b]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril (**90**)



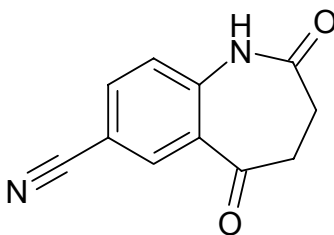
Die Synthese erfolgt nach AAV1 aus 353 mg (1.38 mmol) 2-Brom-7,8-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**43b**), 258 mg (1.52 mmol) 4-Hydrazinobenzonitril-Hydrochlorid (**44c**) und 125 mg (1.52 mmol) Natriumacetat. Man erhält 318 mg (70 %) eines gelben Feststoffs.

Schmp.: 296 °C (Zersetzung), Dunkelfärbung ab 291 °C; IR (KBr): 3293  $cm^{-1}$  (NH), 3085  $cm^{-1}$  (CH-arom.), 2215  $cm^{-1}$  (C≡N), 1689  $cm^{-1}$  (C=O);  $^1H$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.64 – 2.67 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 2.97 – 3.01 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.16 (d, 2H, 8.8 Hz, Teil eines AA'XX' - Systems, arom. H), 7.58 (d, 1H, 8.6 Hz, arom. H), 7.66 (d, 2H, 8.9 Hz, Teil eines AA'XX' - Systems, arom. H), 7.72 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 10.05 (s, 1H, NH), 12.17 (s, 1H, NH);  $^{13}C$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 32.6, 32.9 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 112.7 (2C), 128.7, 133.5, 133.7 (2C) (tert. arom. C-Atome), 100.6, 119.8, 132.1, 134.4, 137.8, 142.2, 147.7 (quart. arom. C-Atome), 173.6 (C=O); ( $C_{16}H_{12}BrN_5O$ ) [370.21] berechnet: C 51.91, H 3.27, N 18.92, gefunden: C 52.06, H 3.29, 18.72.

2-Brom-6-oxo-7,12-dihydro-pyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-carbonitril (91)

Die Synthese erfolgt nach AAV2 aus 300 mg (0.81 mmol) 4-[2-(2-Brom-6-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-9*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-9-yliden)hydrazono]benzonitril (**90**). Man erhält 162 mg (57 %) eines braunen Pulvers.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3331/3231 cm<sup>-1</sup> (NH), 2220 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1676 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.78 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.55 – 7.59 (m, 2H, arom. H), 7.64 (dd, 1H, 8.4/0.5 Hz, arom. H), 7.67 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 8.41 (dd, 1H, 1.4/0.7 Hz, arom. H), 10.43 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 113.3, 124.9, 125.7, 127.3, 132.8 (tert. arom. C-Atome), 101.5, 110.7, 120.4, 126.0, 132.4, 133.4, 134.3, 139.3, 140.2 (quart. arom. C-Atome), 170.7 (C=O); EI/HRMS (C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>4</sub>O) [353.18] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 351.99597, gefunden: 351.99513; Reinheit: 92.7%/93.3% (HPLC, t<sub>s</sub> = 4.54 min, ACN/Wasser: 35/65, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.02 min, AUC = 100%-Methode).

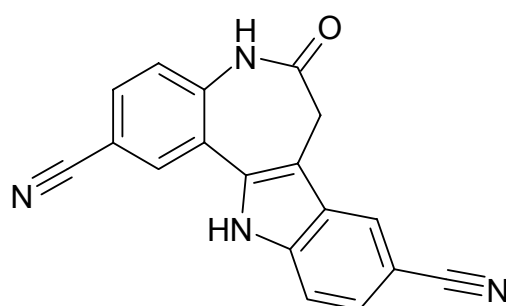
2,5-Dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-1-benzazepin-7-carbonitril (92)



35 mg Zinkcyanid (0.3 mmol), 150 mg (0.5 mmol) 7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46b**), 1.4 mg (0.15 mol%) Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, und 2.0 mg (0.36 mol%) dppf werden in 5 ml trockenem DMF bei 120 °C unter Stickstoffbegasung gerührt. Nach einer Stunde lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt den Ansatz in 15 ml Eiswasser. Ein sich bildender brauner Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 64 mg (64 %) brauner Kristalle.

Schmp.: 287 – 290 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3323 cm<sup>-1</sup> (NH), 3082/3066 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2223 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1695/1671 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.73 – 2.76 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 2.94 – 2.98 (m, 2H, Teil eines AA'XX' - Systems, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.32 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 7.96 (dd, 1H, 8.5/2.1 Hz, arom. H), 8.19 (d, 1H, 2.1 Hz, arom. H), 10.54 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 28.9, 37.2 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 122.6, 135.2, 136.6 (tert. arom. C-Atome), 105.4, 118.1, 126.4, 142.9 (quart. arom. C-Atome), 173.4, 196.6 (C=O); (C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [200.20] berechnet: C 66.00, H 4.03, N 13.99, gefunden: C 65.63, H 4.04, N 13.86.

6-Oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2,9-dicarbonitril (**93**)

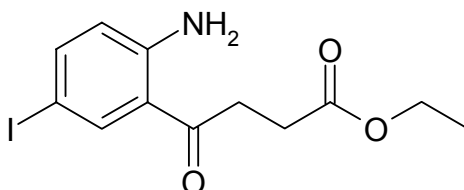


Eine Mischung aus 50 mg (0.25 mmol) 2,5-Dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-1-benzazepin-7-carbonitril (**92**), 70 mg (0.41 mmol) 4-Hydrazinobenzonitril-Hydrochlorid (**44c**) (70 mg, 0.41 mmol) und 33 mg (0.41 mmol) Natriumacetat wird in 5 ml Eisessig bei 70 °C für 2 Stunden gerührt. Man gibt 4 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zu und lässt für 2 weitere Stunden rühren. Der entstehende

Niederschlag wird mit 5-prozentiger Natriumacetat-Lösung und Wasser gewaschen. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol. Man erhält 20 mg (27 %) eines grauen Pulvers.

Schmp.: >330 °C; IR (KBr): 3420 cm<sup>-1</sup> (NH), 3290 cm<sup>-1</sup> (NH), 2223 cm<sup>-1</sup> (C≡N), 1660 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 600 MHz): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.41 (d, 1H, 8.5 Hz, arom. H), 7.55 (dd, 1H, 8.4/1.5 Hz, arom. H), 7.62 (dd, 1H, 8.4/0.5 Hz, arom. H), 7.86 (dd, 1H, 8.5/1.9 Hz, arom. H), 8.22 (d, 1H, 1.9 Hz, arom. H), 8.38 (d, 1H, 0.9 Hz, arom. H), 10.62 (s, 1H, NH), 12.31 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 150,9 MHz): δ (ppm) = 31.3 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 112.8, 122.8, 124.4, 125.2, 131.5, 131.7 (tert. arom. C-Atome), 101.5, 105.7, 109.0, 118.5, 120.4, 122.1, 126.1, 132.9, 139.0, 139.3 (quart. arom. C-Atome), 171.1 (C=O); EI/HRMS (C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O) [298.31] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 298.08545, gefunden: 298.08456; Reinheit: 95.9%/95.1% (HPLC, t<sub>s</sub> = 4.61 min, ACN/Wasser: 35/65, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.02 min, AUC = 100%-Methode).

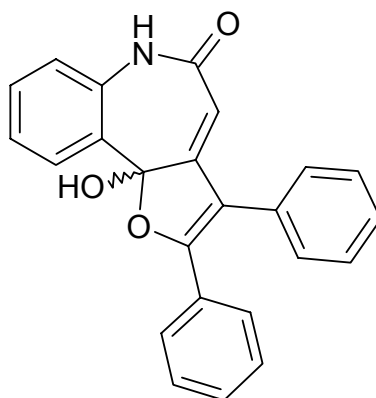
#### 4-(2-Amino-5-iodophenyl)-4-oxobuttersäureethylester (100)



75 mg (0.25 mmol) 7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46b**) werden mit 4.7 mg (0.025 mmol) Kupfer(I)-iodid, 9 mg (0.05 mmol) 1,10-Phenanthrolin, 165 mg (0.5 mmol) Cäsiumcarbonat und 46 mg (1.0 mmol) trockenem Ethanol in 1 ml trockenem Toluol in einem geschlossenen Synthese-Mikrowellenreaktionsgefäß bei 80 °C gerührt. Nach 6 Stunden wird der Ansatz auf eine mit Kieselgel befüllte Fritte gegeben und mit Ethylacetat eluiert. Die organische Phase wird im Vakuum eingeeengt, wobei ein gelbbraunes Öl zurückbleibt. Dieses wird 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und man erhält 10 mg (18 %) gelbbraune Kristalle, die der Analytik unterworfen werden.

Schmp.: 95 – 97 °C; IR (KBr): 3438/3323  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 2977  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.) 1709/1640  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.18 (t, 3H, 7.1 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2.56 – 2.59 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.19 – 3.23 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.05 (q, 2H, 7.1 Hz, O- $\text{CH}_2$ ), 6.66 (d, 1H, 8.8 Hz, arom. H), 7.32 (bs, 2H, NH), 7.48 (dd, 8.8/2.0 Hz, arom. H), 8.02 (d, 1H, 2.0 Hz, arom. H);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.0 ( $\text{CH}_3$ ), 27.9, 33.3 ( $\text{CH}_2$ ), 59.8 (O- $\text{CH}_2$ ), 119.7, 138.7, 141.8 (tert. arom. C-Atome), 74.2, 118.6, 150.3 (quart. arom. C-Atome) 172.4, 199.0 (C=O); EI ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{INO}_3$ ) [347.15] (m/z) [ $\text{M}^+$ ] gefunden: 347 [ $\text{M}$ ] $^{+}$  (50 %), 105 (100%).

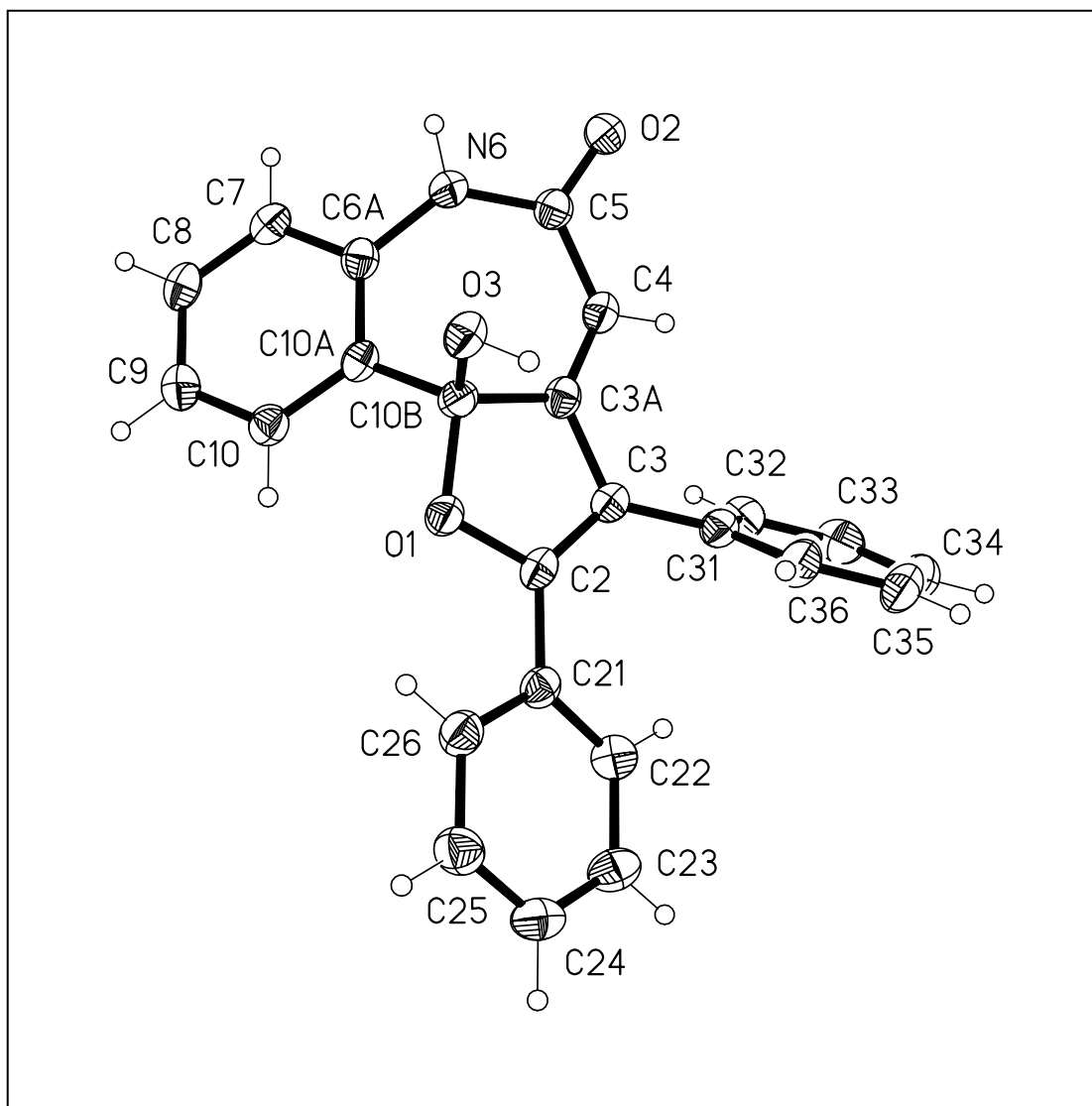
(*RS*)-10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on  
(110)



350 mg (2.0 mmol) 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**46b**) werden mit 420 mg (2.0 mmol) Benzil (**107**) und 960 mg (17 mmol) gemörserten Kaliumhydroxid-Plätzchen in 30 ml Methanol für 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der Ansatz auf 90 ml Wasser gegossen, wobei ein schwachgelber Niederschlag entsteht. Dieser wird abfiltriert und die Mutterlauge wird mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Dabei erhält man einen gelben Feststoff. Der Filterkuchen wird an 4 g Kieselgel adsorbiert und über eine kurze Säule ( $\varnothing$  = 20 mm, 15 g Kieselgel) gereinigt. Zunächst wird mit Ethylacetat/n-Hexan 1:1 überschüssiges Benzil eluiert. Mit einem Gradient über Ethylacetat, Ethylacetat:Ethanol 1:1, bis Ethylacetat:Ethanol 3:7 wird dann **110** eluiert. Die Fraktionen werden im Vakuum unter Erhalt eines gelben Feststoffs eingengt. Dieser wird mit dem gelben Feststoff

vereinigt, der aus der Mutterlauge extrahiert wurde, was zu einer Gesamtausbeute von 37 mg (10 %) führt.

Schmp.: 201 - 203 °C; IR (KBr): 3398  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 3117  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 1648  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 5.31 (d, 1H, 2.0 Hz, Azepin-CH), 7.17 („dt“, 1H, 8.7/7.6/1.2 Hz, arom. H), 7.23 – 7.26 (m, 3H, arom. H), 7.35 – 7.50 (m, 7H, arom. H), 7.53 – 7.56 (m, 2H, arom. H), 7.81 (dd, 1H, 7.8/1.5 Hz, arom. H), 7.99 (s, 1H, OH), 10.27 (d, 1H, 1.8 Hz, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 108.9, 120.8, 123.1, 124.7, 127.4 (2C), 128.1, 128.5 (2C), 129.2 (2C), 129.3, 129.7 (2C), 130.4 (tert. arom. C-Atome), 103.1, 112.5, 128.7, 129.1, 131.0, 135.6, 157.8, 158.6 (quart. arom. C-Atome), 165.2 (C=O); ( $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ ) [367.41] berechnet: C 78.46, H 4.66, N 3.81, gefunden: C 78.12, H 4.74, N 3.78.

Abbildung 11-4: Röntgenkristallstruktur von **110**<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

## Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$C_{24}H_{17}NO_3$	
$M_r$	367.39	
Temperatur	100(2) K	
Wellenlänge	1.54178 Å	
Kristallsystem	Monoclinic	
Raumgruppe	C2/c	
Gitterkonstanten	$a = 18.4354(7)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 10.1214(3)$ Å	$\beta = 105.087(2)^\circ$
	$c = 20.3003(7)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$3657.3(2)$ Å <sup>3</sup>	
Z	8	
Dichte (berechnet)	1.334 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorptionskoeffizient	0.712 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1536	
Kristallgröße	0.22 x 0.08 x 0.05 mm <sup>3</sup>	
$\theta$ -Bereich für die Datenaufnahme	4.51 to 69.69°	
Limitierende Indices	$-21 \leq h \leq 22$ , $-12 \leq k \leq 12$ , $-24 \leq l \leq 24$	
Zahl der Reflexionen	30003	
Unabhängige Reflexionen	3367 [ $R(\text{int}) = 0.0456$ ]	
Vollständigkeit bis $\theta = 69.50^\circ$	97.4 %	
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents	
Max. und min. Transmission	0.7532 and 0.6567	
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on $F^2$	
Daten / Einschränkungen / Parameter	3367 / 0 / 261	
Goodness-of-fit on $F^2$	1.033	
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R1 = 0.0366$ , $wR2 = 0.0925$	
R indices (alle Daten)	$R1 = 0.0485$ , $wR2 = 0.1029$	
Largest diff. peak and hole	0.189 and -0.235 e.Å <sup>-3</sup>	

Tabelle 11-9: Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ). U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$  Tensors.<sup>a,b</sup>

	x	y	z	U(eq)
O(1)	1842.6(5)	5428.0(10)	5637.3(5)	26.7(2)
O(2)	2029.8(6)	8656.5(11)	7967.0(5)	30.9(3)
C(2)	2552.4(8)	5807.3(14)	5619.6(8)	24.6(3)
O(3)	1660.6(6)	4991.2(10)	6702.4(5)	28.6(3)
C(3)	2873.8(8)	6677.3(14)	6120.0(8)	24.3(3)
C(3A)	2335.7(8)	6944.6(14)	6504.5(7)	24.5(3)
C(4)	2396.0(8)	7803.4(15)	7025.2(8)	26.3(3)
C(5)	1853.7(8)	8054.1(14)	7411.3(8)	26.2(3)
N(6)	1120.5(7)	7648.9(13)	7188.7(7)	29.2(3)
C(6A)	670.5(8)	7370.7(14)	6524.2(8)	26.0(3)
C(7)	-58.9(8)	7876.9(15)	6356.3(8)	28.0(3)
C(8)	-534.1(8)	7688.7(15)	5713.8(8)	30.3(3)
C(9)	-285.2(8)	6993.4(15)	5225.3(8)	30.7(3)
C(10)	436.2(8)	6477.4(15)	5391.3(8)	27.2(3)
C(10A)	917.9(8)	6638.2(14)	6040.3(8)	25.0(3)
C(10B)	1682.5(8)	5996.0(14)	6240.8(7)	24.8(3)
C(21)	2809.0(8)	5193.9(14)	5065.5(7)	25.7(3)
C(22)	3430.2(9)	5664.3(15)	4862.7(8)	30.5(3)
C(23)	3658.6(10)	5043.0(16)	4342.3(8)	35.1(4)
C(24)	3264.5(10)	3964.4(17)	4007.2(8)	35.1(4)
C(25)	2641.9(10)	3500.2(16)	4196.7(9)	35.3(4)
C(26)	2416.7(9)	4109.6(16)	4722.2(8)	30.6(3)
C(31)	3657.1(8)	7183.3(15)	6302.2(8)	26.7(3)
C(32)	3816.1(9)	8530.5(16)	6311.4(8)	31.6(4)
C(33)	4559.1(10)	8959.1(17)	6482.8(8)	38.1(4)
C(34)	5142.5(10)	8062.5(19)	6646.1(9)	40.7(4)
C(35)	4987.2(9)	6727.3(19)	6647.7(10)	40.4(4)
C(36)	4249.7(9)	6292.5(17)	6479.9(9)	34.0(4)

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b</sup>Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung

Tabelle 11-10: Bindungslängen [Å] und -winkel [°].<sup>a,b</sup>

O(1)-C(2)	1.3731(17)	C(8)-C(9)	1.388(2)
O(1)-C(10B)	1.4514(17)	C(9)-C(10)	1.386(2)
O(2)-C(5)	1.2486(18)	C(10)-C(10A)	1.394(2)
C(2)-C(3)	1.358(2)	C(10A)-C(10B)	1.509(2)
C(2)-C(21)	1.467(2)	C(21)-C(26)	1.397(2)
O(3)-C(10B)	1.3906(18)	C(21)-C(22)	1.398(2)
C(3)-C(3A)	1.439(2)	C(22)-C(23)	1.386(2)
C(3)-C(31)	1.485(2)	C(23)-C(24)	1.388(2)
C(3A)-C(4)	1.350(2)	C(24)-C(25)	1.384(2)
C(3A)-C(10B)	1.524(2)	C(25)-C(26)	1.386(2)
C(4)-C(5)	1.444(2)	C(31)-C(36)	1.390(2)
C(5)-N(6)	1.3718(19)	C(31)-C(32)	1.394(2)
N(6)-C(6A)	1.4159(19)	C(32)-C(33)	1.392(2)
C(6A)-C(7)	1.396(2)	C(33)-C(34)	1.380(3)
C(6A)-C(10A)	1.398(2)	C(34)-C(35)	1.382(3)
C(7)-C(8)	1.382(2)	C(35)-C(36)	1.385(2)
C(2)-O(1)-C(10B)	108.41(11)	C(9)-C(10)-C(10A)	121.39(14)
C(3)-C(2)-O(1)	113.26(13)	C(10)-C(10A)-C(6A)	118.81(13)
C(3)-C(2)-C(21)	133.07(13)	C(10)-C(10A)-C(10B)	121.69(13)
O(1)-C(2)-C(21)	113.67(12)	C(6A)-C(10A)-C(10B)	119.44(13)
C(2)-C(3)-C(3A)	107.42(13)	O(3)-C(10B)-O(1)	109.09(11)
C(2)-C(3)-C(31)	128.05(13)	O(3)-C(10B)-C(10A)	107.93(11)
C(3A)-C(3)-C(31)	124.27(13)	O(1)-C(10B)-C(10A)	108.90(11)
C(4)-C(3A)-C(3)	128.15(14)	O(3)-C(10B)-C(3A)	112.51(12)
C(4)-C(3A)-C(10B)	125.24(14)	O(1)-C(10B)-C(3A)	103.33(11)
C(3)-C(3A)-C(10B)	106.51(12)	C(10A)-C(10B)-C(3A)	114.87(12)
C(3A)-C(4)-C(5)	127.60(14)	C(26)-C(21)-C(22)	118.58(14)
O(2)-C(5)-N(6)	116.47(14)	C(26)-C(21)-C(2)	119.12(13)
O(2)-C(5)-C(4)	121.48(14)	C(22)-C(21)-C(2)	122.29(14)
N(6)-C(5)-C(4)	122.05(14)	C(23)-C(22)-C(21)	120.32(15)
C(5)-N(6)-C(6A)	131.00(14)	C(22)-C(23)-C(24)	120.43(15)
C(7)-C(6A)-C(10A)	119.52(13)	C(25)-C(24)-C(23)	119.81(15)
C(7)-C(6A)-N(6)	116.60(13)	C(24)-C(25)-C(26)	119.94(15)
C(10A)-C(6A)-N(6)	123.88(13)	C(25)-C(26)-C(21)	120.90(15)
C(8)-C(7)-C(6A)	120.90(14)	C(36)-C(31)-C(32)	118.87(14)
C(7)-C(8)-C(9)	119.87(14)	C(36)-C(31)-C(3)	119.25(14)
C(10)-C(9)-C(8)	119.48(14)	C(32)-C(31)-C(3)	121.87(14)



C(33)-C(32)-C(31)	119.87(15)	C(34)-C(35)-C(36)	120.08(16)
C(34)-C(33)-C(32)	120.65(16)	C(35)-C(36)-C(31)	120.86(16)
C(33)-C(34)-C(35)	119.66(16)		

---

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b</sup>Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 11-11: Torsionswinkel [°].<sup>a,b</sup>

C(10B)-O(1)-C(2)-C(3)	-5.45(16)	C(10)-C(10A)-C(10B)-C(3A)	124.35(15)
C(10B)-O(1)-C(2)-C(21)	174.61(11)	C(6A)-C(10A)-C(10B)-C(3A)	-58.29(18)
O(1)-C(2)-C(3)-C(3A)	-1.45(17)	C(4)-C(3A)-C(10B)-O(3)	-69.30(18)
C(21)-C(2)-C(3)-C(3A)	178.48(15)	C(3)-C(3A)-C(10B)-O(3)	107.37(13)
O(1)-C(2)-C(3)-C(31)	172.82(13)	C(4)-C(3A)-C(10B)-O(1)	173.18(13)
C(21)-C(2)-C(3)-C(31)	-7.2(3)	C(3)-C(3A)-C(10B)-O(1)	-10.14(14)
C(2)-C(3)-C(3A)-C(4)	-176.10(15)	C(4)-C(3A)-C(10B)-C(10A)	54.71(19)
C(31)-C(3)-C(3A)-C(4)	9.4(2)	C(3)-C(3A)-C(10B)-C(10A)	-128.62(13)
C(2)-C(3)-C(3A)-C(10B)	7.35(16)	C(3)-C(2)-C(21)-C(26)	165.77(16)
C(31)-C(3)-C(3A)-C(10B)	-167.19(13)	O(1)-C(2)-C(21)-C(26)	-14.30(19)
C(3)-C(3A)-C(4)-C(5)	-179.40(14)	C(3)-C(2)-C(21)-C(22)	-14.9(3)
C(10B)-C(3A)-C(4)-C(5)	-3.5(2)	O(1)-C(2)-C(21)-C(22)	165.06(13)
C(3A)-C(4)-C(5)-O(2)	164.74(15)	C(26)-C(21)-C(22)-C(23)	-1.5(2)
C(3A)-C(4)-C(5)-N(6)	-15.4(2)	C(2)-C(21)-C(22)-C(23)	179.15(14)
O(2)-C(5)-N(6)-C(6A)	155.66(15)	C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	1.3(2)
C(4)-C(5)-N(6)-C(6A)	-24.2(2)	C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	-0.4(2)
C(5)-N(6)-C(6A)-C(7)	-135.47(16)	C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	-0.3(2)
C(5)-N(6)-C(6A)-C(10A)	44.2(2)	C(24)-C(25)-C(26)-C(21)	0.1(2)
C(10A)-C(6A)-C(7)-C(8)	-1.4(2)	C(22)-C(21)-C(26)-C(25)	0.7(2)
N(6)-C(6A)-C(7)-C(8)	178.23(14)	C(2)-C(21)-C(26)-C(25)	-179.87(14)
C(6A)-C(7)-C(8)-C(9)	-0.3(2)	C(2)-C(3)-C(31)-C(36)	-57.7(2)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	0.9(2)	C(3A)-C(3)-C(31)-C(36)	115.68(17)
C(8)-C(9)-C(10)-C(10A)	0.2(2)	C(2)-C(3)-C(31)-C(32)	123.40(18)
C(9)-C(10)-C(10A)-C(6A)	-1.9(2)	C(3A)-C(3)-C(31)-C(32)	-63.2(2)
C(9)-C(10)-C(10A)-C(10B)	175.45(13)	C(36)-C(31)-C(32)-C(33)	1.3(2)
C(7)-C(6A)-C(10A)-C(10)	2.5(2)	C(3)-C(31)-C(32)-C(33)	-179.75(14)
N(6)-C(6A)-C(10A)-C(10)	-177.13(14)	C(31)-C(32)-C(33)-C(34)	-0.2(2)
C(7)-C(6A)-C(10A)-C(10B)	-174.92(13)	C(32)-C(33)-C(34)-C(35)	-0.8(3)
N(6)-C(6A)-C(10A)-C(10B)	5.4(2)	C(33)-C(34)-C(35)-C(36)	0.6(3)
C(2)-O(1)-C(10B)-O(3)	-110.49(12)	C(34)-C(35)-C(36)-C(31)	0.6(3)
C(2)-O(1)-C(10B)-C(10A)	131.94(12)	C(32)-C(31)-C(36)-C(35)	-1.5(2)
C(2)-O(1)-C(10B)-C(3A)	9.40(14)	C(3)-C(31)-C(36)-C(35)	179.52(15)
C(10)-C(10A)-C(10B)-O(3)	-109.24(15)		
C(6A)-C(10A)-C(10B)-O(3)	68.11(16)		
C(10)-C(10A)-C(10B)-O(1)	9.06(18)		
C(6A)-C(10A)-C(10B)-O(1)	-173.59(12)		

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b</sup>Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung

Tabelle 11-12: Wasserstoffbrückenbindungen [Å und °].<sup>a,b</sup>

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(3)-H(03)...O(2)#1	0.94(2)	1.75(2)	2.6946(15)	177.1(19)
C(25)-H(25)...O(2)#2	0.95	2.43	3.287(2)	149.5
C(34)-H(34)...O(3)#3	0.95	2.51	3.390(2)	153.2

Symmetrietransformationen wurden für die Generierung äquivalenter Atome benutzt:

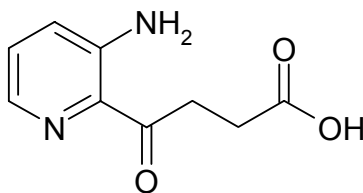
#1  $-x+1/2, y-1/2, -z+3/2$

#2  $x, -y+1, z-1/2$

#3  $x+1/2, y+1/2, z$

<sup>a</sup>Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

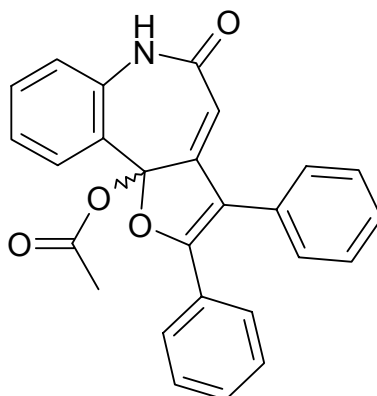
<sup>b</sup>Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

4-(3-Aminopyridin-2-yl)-4-oxobuttersäure (112)

176 mg (1.0 mmol) 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**43a**) werden mit 210 mg (1.0 mmol) Benzil (**107**) und 480 mg (8.5 mmol) gemörserten Kaliumhydroxid-Plätzchen in 15 ml Methanol für 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird auf 30 ml Wasser gegossen und mit 5 x 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der entstandene farblose Niederschlag wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 90 mg (46 %) farblose lange Nadeln.

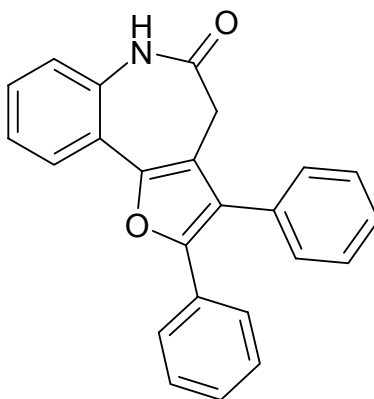
Schmp.: 150 – 153 °C; IR (KBr): 3445/3340  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 2962/2927  $\text{cm}^{-1}$  (CH-aliph.), 1698/1668  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.52 – 2.56 (m, 2H, AA'XX'-System,  $\text{CH}_2$ ), 3.33 – 3.36 (m, 2H, AA'XX'-System,  $\text{CH}_2$ , teilweise durch Wasserpeak überdeckt), 7.12 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.21 (dd, 1H, 8.5/1.5 Hz, arom. H), 7.30 (dd, 1H, 8.5/4.0 Hz, arom. H), 7.89 (dd, 1H, 4.0/1.5 Hz, arom. H), 12.04 (br s, 1H, COOH);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.0, 38.9 ( $\text{CH}_2$ ), 124.8, 128.5, 136.4 (tert. arom. C-Atome), 132.3, 146.6 (quart. arom. C-Atome), 174.1, 202.4 (C=O); ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3 \times 0.5 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) [217.22] berechnet: C 55.29, H 6.03, N 12.90, gefunden: C 54.78, H 5.53, N 12.51

(RS)-5-Oxo-2,3-diphenyl-5,6-dihydro-10bH-furo[3,2-d][1]benzazepin-10b-yl-acetat  
**(114)**



36 mg (0.1 mmol) 10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**110**) wird mit 100 mg (0.21 mmol) Ammoniumeisen(III)sulfat-Dodekahydrat und mit 120 mg (0.16 mmol) Ammoniumacetat in 5 ml Eisessig refluxiert. Nach 2 Stunden lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt den Ansatz auf 15 ml Wasser. Ein entstehender grauer Niederschlag wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 17 mg (43 %) gräuliche Kristalle.

Schmp. 236 – 236 °C; IR (KBr): 3200 cm<sup>-1</sup> (NH), 3064 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2980/2932 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1749/1671 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.78 (d, 1H, 1.2 Hz, Azepin-CH), 7.29 – 7.40 (m, 7H, arom. H), 7.45 – 7.56 (m, 6H, arom. H), 8.00 (dd, 1H, 7.7/1.4 Hz, arom. H), 10.87 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 19.9 (CH<sub>3</sub>), 67.6 (Azepin-CH), 121.2, 123.8, 125.3, 125.6 (2C), 128.2, 128.3, 128.7 (2C), 129.0 (2C), 129.3, 129.8 (2C) (tert. arom. C-Atome), 118.1, 119.0, 122.5, 129.5, 130.9, 134.2, 148.5, 149.4 (quart. arom. C-Atome), 164.9, 168.9 (C=O); EI/HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>) [409.45] (m/z) [M<sup>+</sup>] berechnet: 409.13141, gefunden: 409.13110; Reinheit: 89.6%/90.0% (HPLC, t<sub>s</sub> = 4.27 min, ACN/Wasser: 65/35, Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.02 min, AUC = 100%-Methode).

2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5H-furo[3,2-d][1]benzazepin-5-on (115)

55 mg (0.15 mmol) 10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5H-furo[3,2-d][1]benzazepin-5-on (**110**) und 169 mg (0.75 mmol) Zinn(II)-chlorid-Dihydrat werden in einer Mischung aus 3 ml Eisessig und 0.1 ml konzentrierter Salzsäure bei 80 °C gerührt. Nach 10 Minuten bildet sich ein farbloser Niederschlag der nach Abkühlung auf Raumtemperatur abgesaugt wird. Anschließend wird der Niederschlag mit Wasser und Petrolether gewaschen. Man erhält 23 mg (43 %) eines weißen Pulvers.

Schmp.: 277 – 279 °C; IR (KBr): 3193 cm<sup>-1</sup> (NH), 3057 cm<sup>-1</sup> (CH-arom.), 2974 cm<sup>-1</sup> (CH-aliph.), 1659 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.18 (s, 2H, Azepin-CH<sub>2</sub>), 7.24 – 7.42 (m, 9H, arom. H), 7.45 – 7.56 (m, 4H, arom. H), 7.86 (dd, 1H, 7.8/1.5 Hz, arom. H), 10.32 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100,6 MHz): δ (ppm) = 30.9 (Azepin-CH<sub>2</sub>), 121.8, 123.8, 125.1, 125.3 (2C), 127.9, 128.1, 128.6, 128.7 (2C), 129.1 (2C), 129.7 (2C) (tert. arom. C-Atome), 117.8, 120.0, 123.1, 130.0, 131.5, 134.5, 146.3, 149.0 (quart. arom. C-Atome), 170.2 (C=O); (C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>) [351.41] berechnet: C 82.03, H 4.88 N 3.99, gefunden: 81.58, H 4.91, N 3.86; Reinheit: 99.9%/99.9% (HPLC, t<sub>s</sub> = 3.60 min, ACN/Wasser: 75/25 Säulenofentemperatur 40 °C, t<sub>m</sub>(DMSO) = 1.03 min, AUC = 100%-Methode).

## Anhang zum Kapitel 11.2: Gefahrstoffe

Über die toxikologischen Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen liegen keine Daten im Sinne des Chemikaliengesetzes vor. Gefährliche Eigenschaften können nicht ausgeschlossen werden. Sie sind mit der für gefährliche Chemikalien üblichen Vorsicht zu behandeln.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete gefährliche Stoffe und Zubereitungen, deren Gebrauch besondere Vorsicht gebietet, sind im Folgenden aufgelistet.

### Bortribromid: T+ sehr giftig, C ätzend

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 14	Reagiert heftig mit Wasser
R 26/28	Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :	
S (1/2)	Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt)
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben)
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)

### Bortrifluorid: T+ sehr giftig, C ätzend

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 14	Reagiert heftig mit Wasser
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen



## Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :

S (1/2)	Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt)
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben)
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)

Brom: T+ Sehr giftig, C Ätzend, N Umweltgefährlich

## Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen

## Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :

S (1/2)	Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt)
S 7/9	Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Bromessigsäuremethylester: T giftig

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

- |            |   |
|------------|---|
| R 25       | Giftig beim Verschlucken                    |
| R 36/37/38 | Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut |

Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :

- |      |   |
|------|---|
| S 26 | Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren      |
| S 37 | Geeignete Schutzhandschuhe tragen   |
| S 45 | Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen) |

1,2-Dichlorethan: F leichtentzündlich, T giftig

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

- |            |   |
|------------|---|
| R 45       | Kann Krebs erzeugen                         |
| R 11       | Leichtentzündlich                           |
| R 22       | Auch gesundheitsschädlich beim Verschlucken |
| R 36/37/38 | Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut |

Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :

- |      |   |
|------|---|
| S 53 | Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen                          |
| S 45 | Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen) |

Diethylether: F+ hochentzündlich, Xn gesundheitsschädlich

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

- |      |  |
|------|--|
| R 12 | Hochentzündlich  |
| R 19 | Kann explosionsfähige Peroxide bilden                          |
| R 22 | Gesundheitsschädlich beim Verschlucken                         |
| R 66 | Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen |
| R 67 | Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen       |

Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :

- |       |  |
|-------|--|
| S (2) | Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt) |
|-------|--|

S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 16	Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
S 29	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
S 33	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen

N,N-Dimethylformamid: T giftig

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 20/21	Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 36	Reizt die Augen
Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :	
S 53	Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)

n-Hexan: F leichtentzündlich, Xn gesundheitsschädlich, N umweltgefährlich

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 11	Leichtentzündlich
R 38	Reizt die Haut
R 48/20	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 65	Gesundheitsschädlich: kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :	
S (2)	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt)
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort

	aufbewahren
S 16	Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
S 29	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
S 33	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
S 62	Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen

Hydrazin-Hydrat: T giftig, N umweltgefährlich

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 45	Kann Krebs erzeugen
R 10	Entzündlich
R 23/24/25	Auch giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut
R 34	Verursacht Verätzungen
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :

S 53	Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 60	Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

N-Methyl-2-pyrrolidon: Xi reizend

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :	
S (2)	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt)
S 41	Explosions- und Brandgase nicht einatmen

Phenylhydrazine: T giftig, N umweltgefährlich

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 45	Kann Krebs erzeugen
R 23/24/25	Auch giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 48/23/24/25	Auch giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 68	Irreversibler Schaden möglich
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen
Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :	
S 53	Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Kaliumhydrid: F leichtentzündlich, C ätzend

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 14/15	Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
R 34	Verursacht Verätzungen
Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :	
S 16	Von Zündquellen fernhalten
S 26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt

	konsultieren
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)

Schwefelwasserstoff: F+ hochentzündlich, T+ sehr giftig, N umweltgefährlich

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 12	Hochentzündlich
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen
Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :	
S (1/2)	Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt)
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 16	Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S 38	Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Zinkcyanid: T+ sehr giftig, N umweltgefährlich

Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze) :

R 26/27/28	Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

## Sicherheitsratschläge (S-Sätze) :

S (1/2)	Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren (wenn für die allgemeine Öffentlichkeit bestimmt)
S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben)
S 29	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 60	Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

## 11.3 Docking

Die in Abschnitt 4 angesprochenen Docking-Scores, die mit FlexX<sup>140</sup> erzeugt wurden finden sich in der folgenden Tabelle.

**Tabelle 11-13:** Docking-Scores verschiedener Paullonderivate

Docking A <sup>1</sup>		Docking B <sup>2</sup>		Docking C <sup>3</sup>	
Verbindung	Score	Verbindung	Score	Verbindung	Score
<b>2h</b>	-38,81	<b>2h</b>	-33,85	<b>2h</b>	-29,38
<b>2c</b>	-31,49	<b>2l</b>	-28,22	<b>2j</b>	-22,89
<b>3c</b>	-30,54	<b>2j</b>	-27,74	<b>2a</b>	-22,8
<b>2f</b>	-30,04	<b>2a</b>	-27,65	<b>2d</b>	-22,64
<b>1a</b>	-29,79	<b>2b</b>	-27,56	<b>2g</b>	-22,53
<b>2d</b>	-29,72	<b>2d</b>	-27,54	<b>3c</b>	-22,43
<b>2j</b>	-29,11	<b>2e</b>	-27,5	<b>2c</b>	-22,36
<b>2l</b>	-28,49	<b>2i</b>	-27,34	<b>2m</b>	-22,2
<b>2k</b>	-28,44	<b>3c</b>	-27,3	<b>2l</b>	-22,02
<b>2a</b>	-27,9	<b>2c</b>	-27,25	<b>2i</b>	-21,87
<b>2b</b>	-27,89	<b>2g</b>	-27,1	<b>2e</b>	-21,4
<b>2e</b>	-27,86	<b>2m</b>	-27,08	<b>2b</b>	-21,36
<b>2i</b>	-27,7	<b>3e</b>	-26,97	<b>2k</b>	-21,29
<b>2m</b>	-27,66	<b>1a</b>	-26,6	<b>1a</b>	-21,17
<b>2g</b>	-27,45	<b>2k</b>	-25,94	<b>2f</b>	-21,1
<b>3e</b>	-27,2	<b>4a</b>	-25,93	<b>3e</b>	-20,99
<b>3a</b>	-27,02	<b>3a</b>	-25,74	<b>3a</b>	-20,92
<b>4a</b>	-26,32	<b>2f</b>	-24,08	<b>4a</b>	-20,63
<b>4g</b>	-24,32	<b>4g</b>	-23,55	<b>4g</b>	-19,48
<b>2n</b>	-21,25	<b>2n</b>	-20,94	<b>2n</b>	-18,99
<b>89</b>	-7,9	<b>89</b>	-8,04	<b>89</b>	-9,09

<sup>1</sup>bezieht sich auf Docking unter Erhalt der Wassermoleküle W1-W4 (vgl. Abschnitt 4.4.1.2)

<sup>2</sup>bezieht sich auf Docking unter Erhalt der Wassermoleküle W2-W4 (vgl. Abschnitt 4.4.1.2)

<sup>3</sup>bezieht sich auf Docking unter Entfernung der Wassermoleküle W1-W4 (vgl. Abschnitt 4.4.1.2)



Neben der in Abschnitt 4.4.1.2 beschriebenen Vorgehensweise beim Docking mittels FlexX wurden drei weitere Verbindungen mit einer alternativen Methode gedockt.

Beide Verfahren positionieren die Liganden in einer Orientierung, die in guter Übereinstimmung mit der Lage des Alsterpaullons in der ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$ -Kristallstruktur ist. Dabei ist festzuhalten, dass die beiden Docking-Verfahren nicht über die Dockinglösungen der Liganden miteinander verglichen werden sollten. Vielmehr sollten die möglichen Orientierungen der Liganden in der Bindetasche visualisiert werden.

Die Verbindungen **2q**, **3q** und **2s** wurden in MOE<sup>224</sup> mit dem MMFF94-Kraftfeld energieminiert. Anschließend wurden Konformere mittels OMEGA<sup>225</sup> erzeugt, die dann mittels FRED<sup>226</sup> in die ATP-Bindetasche der GSK-3 $\beta$  (1Q3W)<sup>56</sup> gedockt wurden.

Die Positionierung der Liganden ist in Abschnitt Abschnitt 6.1.6 dargestellt.

## 11.4 Biologische Daten

### 11.4.1 Kinaseaufbereitung und –Assays

Alle im folgenden Abschnitt und in Abschnitt 11.4.2 beschriebenen Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe um L. Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) durchgeführt.

Kinaseaktivitäten wurden in Puffer A oder C bei 30 °C mit einer finalen ATP-Konzentration von 15 µM bestimmt. Blindproben wurden subtrahiert und die Aktivitäten wurden als pMol aufgenommenes Phosphat während 30 minütiger Inkubationszeit berechnet. Die Aktivitäten werden in % der maximalen Aktivität (bei Abwesenheit von Inhibitoren) ausgedrückt. Kontrollproben erfolgten mit entsprechenden DMSO-Verdünnungen. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Standardfehler bei den IC<sub>50</sub>-Werten der Aktivitätsmessungen lag unter 5 %.

CDK1/Cyclin B wurde in einem Homogenisations-Puffer aus sich in der M-Phase befindlichen Seesternoozyten (*Marthasterias glacialis*) extrahiert und mittels Affinitätschromatographie an p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose-Kügelchen aufgereinigt. Elution erfolgte mit freiem p9<sup>CKShs1</sup>, wie zuvor beschrieben.<sup>213</sup> Die Kinaseaktivität wurde in Puffer C, mit 1 mg Histon H1/ml, in Gegenwart von 15 µM [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP (3,000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) mit einem finalen Volumen von 30 µl untersucht. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C wurden 25 µl Anteile des Zentrifugats auf Whatman P81 Phosphorcellulose-Papierfilter aufgetragen. 20 sec später wurden die Filter fünf Mal (jedes Mal mindestens 5 min) in einer Lösung von 1-prozentiger (v/v) Phosphorsäure gewaschen. Die nassen Filter wurden einer Szintillationsmessung in Gegenwart von ACS (Amersham) Szintillationflüssigkeit unterzogen.

CDK5/p25 wurde durch das Mischen gleicher Mengen von rekombinanter Säuger CDK5 und p25 hergestellt, welche in *E. coli* als GST (Glutathion-S-Transferase) Fusionsproteine exprimiert werden. Aufreinigung erfolgt über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose (Die Vektoren wurden freundlicherweise von Dr. L. H. Tsai zur Verfügung gestellt) (p25 ist eine verkürzte

Version von p35, dem 35 kDa schweren CDK5-Aktivator, vgl. Abschnitt 1.1.2). Die Aktivität wird wie für CDK1/Cyclin B beschrieben, über Histon H1 in Puffer C bestimmt.

GSK-3 $\alpha/\beta$  wurde durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Axin aus Schweinehirn aufgereinigt.<sup>214</sup> Die Aktivitätsbestimmung erfolgte über eine 1/100 Verdünnung in 1 mg BSA/ml 10 mM DTT, mit 5  $\mu$ l 4  $\mu$ M GS-1 Peptidsubstrat, in Puffer A, in Gegenwart von 15  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP (3,000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) und in einem finalen Volumen von 30  $\mu$ l. Nach 30 min Inkubationszeit bei 30 °C wurden 25  $\mu$ l Anteile des Zentrifugats weiter bearbeitet wie oben beschrieben.

CK1 $\delta/\epsilon$  wurde durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Axin aus Schweinehirn aufgereinigt.<sup>227</sup> Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie für CDK1 beschrieben, jedoch unter Verwendung eines CK1-spezifischen Peptidsubstrats.

Tabelle 11-14: IC<sub>50</sub>- Werte der getesteten Verbindungen<sup>a</sup>

Verbindung	IC <sub>50</sub> -Werte					Dyrk1a
	CDK1/ Cyclin B	CDK5/ p25	GSK3	CK1	CDK2/ Cyclin A	
<b>2a</b>	2.0 <sup>57</sup>	4.2 <sup>57</sup>	0,018 <sup>57</sup>			
<b>2b</b>	4,5	3	0,080	>=10	1,8	3
<b>2c</b>	0,5	0,3	0,008	>10	0,060	8
<b>2d</b>	1,65	10	0,008	>10	2,0	>10
<b>2e</b>	>10	>10	0,063	>10	2,1	>10
<b>2f</b>	1	6	0,025	>=10	0,6	>10
<b>2g</b>	7	9	0,80	>10		
<b>2h</b>	2,2	30	100	>10		
<b>2i</b>	2	4	0,8	>10		
<b>2j</b>	8	>10	0,13	>10	1,8	>10
<b>2k</b>	4	5	1,40	>10	1,4	1
<b>2l</b>	>10 (20)	>10	1,8	>10		
<b>2m</b>	0,41	2,0	0,12	>10		
<b>2n</b>	>30	100	3,4	>10		
<b>2o</b>	>10	3	1	>10		
<b>2p</b>	>10	>10	13	>10		
<b>2q</b>	>10	>10	2,1	>10		
<b>2r</b>	>10	>10	>10	>10		
<b>2s</b>	>10	>10	0,41	>10		
<b>3a</b>	0,11	0,18	0,052	>10		
<b>3b</b>	1,2	0,26	0,051	>10		
<b>3c</b>	0,031	0,032	0,021	>10		
<b>3d</b>	0,19	0,12	0,013	>10		
<b>3e</b>	0,12	0,21	0,018	>10		
<b>3i</b>	0,2	0,4	0,39	>10		
<b>3o</b>	8,0	>10	0.40	>10		
<b>3p</b>	3,8	>10	0,8	>10		
<b>3q</b>	>10	>10	0,41	>10		
<b>4a</b>	>10	>10	>10	>10		

IC<sub>50</sub>-Werte

Verbindung	CDK1/ Cyclin B	CDK5/ p25	GSK3	CK1	CDK2/ Cyclin A	Dyrk1a
<b>4e</b>	>10	>10	>10	>10		
<b>4g</b>	>10	>10	>10	>10		
<b>89</b>	60	>100	40	>10		
<b>91</b>	>10	>10	3,8	>10		
<b>93</b>	0,12	0,73	0,028	>10		
<b>110</b>	8,2	>10	>10	>10		
<b>115</b>	>10	>10	>10	>10		

<sup>a</sup>Die Durchführung der Testungen erfolgte durch L. Meijer und Mitarbeitern, CNRS Station Biologique, Roscoff (Frankreich).

### 11.4.2 $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung in humanen SH-SY5Y

#### Neuroblastomazellen

Nahezu konfluente humane SH-SY5Y Neuroblastomazellen wurden in Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) in DMEM (bestückt mit 10 % fötalem Kalbserum (von Invitrogen) und mit Antibiotika (Penicillin-Streptomycin von Lonza)) kultiviert. Die Zellen wurden dann mit den zu testenden Verbindungen und 2  $\mu$ M MG132 behandelt (um eine Anreicherung des Phospho- $\beta$ -Catenin zu gewährleisten). Die finale DMSO-Konzentration lag unter 1 %. Die Zellen wurden anschließend einem ELISA unterzogen unter Verwendung von Antikörpern gegen Ser33/Ser37/Thr41-phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (1:1000) (von Cell Signaling Technology). Die Ergebnisse sind in % der maximalen  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung angegeben (in nur mit MG132 behandelten Zellen zur Positivkontrolle, 100-prozentige Phosphorylierung).

### 11.4.3 INS-1E- und $\beta$ -Zellaufbereitung sowie zugehörige Assays

Alle im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen wurden durch R. Mußmann und Mitarbeitern bei der DeveloGen AG, Göttingen durchgeführt.

Zellkulturen der INS-1E-Zellen wurden in einem Kulturmedium (RPMI 1640 mit 11mM Glucose, 5 % fötalem Kalbserum, 10 mM HEPES, 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat) aufbewahrt und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in einer humiden Atmosphäre kultiviert; wie bei Merglen und Mitarbeitern beschrieben.<sup>131</sup> Ausnahmen davon sind aufgeführt. Die Zellen wurden 6 – 8 Tage vor Behandlung in Gewebekulturflaschen mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> angesetzt. In der Wachstumsperiode wurde das Medium zweimal gewechselt.

Isolierung der Ratteninseln erfolgte über eine standardisierte Liberase-Verdauungsmethode aus Rattenpankreas (Liberase™ CI Enzymmischung BMB von Roche Applied Science). Dazu werden 10 ml eiskalte Liberase-Lösung über den Gallengang in den Pankreas injiziert. Nach der Präparierung des Pankreas wurde für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend durch weiteres Zupipettieren der Liberase-Lösung aufgelöst. Die Inseln wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt, manuell aufgenommen und in Kavitäten von Mikrotiterplatten platziert. Zugabe von der für die Versuche relevanten Reagenzien erfolgte wie weiter unten beschrieben. Für die qRT-PCR wurden die Zellen in Trizol™ geerntet und zügig in Trockeneis verbracht. Die RNA wurde nach gebräuchlichen Methoden extrahiert.

#### Viabilitäts-Assay, Caspase-Aktivitäts-Assay und DNA-Fragmentierungs-Assay

INS-1E-Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) (black 96 well tissue culture plates von Falcon) angesetzt und in 100  $\mu$ l Kulturmedium/Kavität unter Zusatz von 100 IE/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin für drei Tage kultiviert. Die metabolische Aktivität oder Viabilität der INS-1E-Zellen wurde durch die mitochondriale Reduktion des atoxischen Farbstoffs Alamar Blue (von Biosource) bewertet. Der Farbstoff wurde 4 Stunden vor der Auswertung nach Herstelleranweisung zugegeben. Die Apoptose-induzierenden Bedingungen wurden durch die Zugabe einer Kombination aus an bovinem

Serumalbumin gekoppeltem Palmitat (0,3 mM Palmitat, bovines Serumalbumin (Natriumpalmitat/fettsäurefreies bovines Serumalbumin 6:1)) und Glucose (25 mM) zum Medium und einer 24 stündigen Inkubationsphase erzeugt. Die zu testenden Verbindungen wurden 1 Stunde vor Zugabe der Apoptose-induzierenden Reagenzien zugesetzt. Die Caspase-Aktivität wurde durch einen Enzym-Assay (homogeneous caspase assay, von Roche Applied Science) quantifiziert. Die Caspase-Aktivität wurde laut Herstelleranweisung 3 Stunden nach Zusatz des Caspase-Substrats gemessen. Die Apoptoserate wurde zusätzlich durch die Ermittlung von Mono- und Oligonucleosomen in der cytoplasmatischen Fraktion der Zelllysate bestimmt. Dazu wurde ein Zelltod-ELISA-Kit (von Roche Applied Science) angewendet. Die Assay basiert auf einem quantitativen Sandwich-Enzym Immunoassay-Prinzip, das murine monoklonale anti-Histon- und anti-DNA-Peroxidase-Antikörper verwendet. Die relative Apoptoserate wurde photometrisch durch die Messung der Peroxidaseaktivität der Immunkomplexe bei 405 nm bestimmt. Die photometrischen Messungen wurden mit einem FLUOstar Optima-Reader (von BMG Labtechnologies) durchgeführt.

#### *In Vitro $\beta$ -Zell-Proliferations-Assay*

Frisch isolierte Ratteninseln wurden *in vitro* mit bzw. ohne Zugabe der zu testenden Agenzien für 48 oder 72 Stunden kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen vorsichtig durch  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen freie Phosphat-gepufferte Salzlösung dispergiert. Die resultierende Einzelzellsuspension wurde auf Adhäsivfolie (von Fa. Superior Marienfeld) aufgebracht (3000 – 6000 Zellen pro Kavität). Die anhaftenden Inselzellen wurden fixiert und durch Standard-Immunofluoreszenz-Methoden gegen das C-Peptid (ein Fragment von Proinsulin) und gegen den nukleären Proliferationsmarker Ki-67 angefärbt. Mit einem Olympus Mikroskop, ausgestattet mit einem automatischen Bildaufnahmeverfahren (Olympus), wurden die C-Peptid positiven Zellen ausgezählt. Sich in Proliferation befindliche doppelt C-Peptid-/Ki-67-positive Zellen wurden manuell gezählt.

#### *BrdU-Markierung und Detektion von proliferierenden Zellen*

INS-1E-Zellen wurden in Kulturplatten (96-Kavitäten) angesetzt und kultiviert wie für den Caspase-Assay beschrieben. Die BrdU-Markierung und Detektion wurde mit einem kommerziell erhältlichen Testsystem (cell proliferation ELISA, BrdU

(chemiluminescence) Roche Applied Science) nach Herstellerangaben ausgeführt. Dabei wurden die Zellen 24 Stunden mit den zu testenden Substanzen kultiviert. 4 Stunden vor der Fixierung der Zellen wird die BrdU-Lösung dem Medium zugegeben. Die Fixierung erfolgt mit FixDenat-Lösung, danach wird mit monoklonalen anti-BrdU-Peroxidase-Antikörpern inkubiert. Nachdem die Substratlösung den Kavitäten zugefügt wurde, wird die Lichtemission mit einem Mikroplatten-Luminometer unter Verwendung eines Analyst™ HT-Detektionssystem (von LJI Biosystems Inc.) gemessen.

#### Quantitative Reverse Transkriptions-PCR

Die gesamte RNA von  $8 \times 10^4$  INS-1E-Zellen, die auf einer  $4 \text{ cm}^2$  großen Oberfläche einer Kulturschale kultiviert waren, wurden mit einem Qiagen RNAeasy-Kit (von Qiagen) nach Herstelleranweisung extrahiert. 2  $\mu\text{g}$  wurden davon in cDNA umgewandelt. Das Primerdesign erfolgte durch Verwendung der Software Primer Express 1.5 (von Applied Biosystems). Die Primer waren auf Nachfrage verfügbar. Für die qRT-PCR wurde ein Applied Biosystems SDS 7000 Detektionssystem verwendet. Die Genamplifikation wurde zweifach durchgeführt, wobei Mittelwerte auf die Mittelwerte der Referenz-RNA (18 S RNA) normiert wurden. Mittlere Genexpressionswerte sind in Cycle-Grenzwerten  $\pm$  SD angegeben und wurden von 3 Kavitäten mit unbehandelten INS-1E-Zellen bzw. unbehandelten Ratteninseln, die 4 bzw. 24 Stunden im Kulturmedium aufbewahrt wurden, bestimmt.



## 12 Literaturverzeichnis

- (1) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
- (2) Sachsenmaier, C. Targeting protein kinases for tumor therapy. *Onkologie* **2001**, 24, 346-355.
- (3) Melnikova, I.; Golden, J. Targeting protein kinases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 993-994.
- (4) Embi, N.; Rylatt, D. B.; Cohen, P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* **1980**, 107, 519-527.
- (5) Van Wauwe, J.; Haefner, B. Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention. *Drug News Perspect.* **2003**, 16, 557-565.
- (6) Cohen, P.; Goedert, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 479-487.
- (7) Ryder, J.; Su, Y.; Ni, B. Akt/GSK3 $\beta$  serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. *Cell. Signal.* **2004**, 16, 187-200.
- (8) Phiel, C. J.; Wilson, C. A.; Lee, V. M.; Klein, P. S. GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* **2003**, 423, 435-439.
- (9) Gould, T. D. Targeting glycogen synthase kinase-3 as an approach to develop novel mood-stabilising medications. *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, 10, 377-392.
- (10) Liao, X.; Zhang, L.; Thrasher, J. B.; Du, J.; Li, B. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, 2, 1215-1222.
- (11) Wakefield, J. G.; Stephens, D. J.; Jeremy, M. A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. *J. Cell Sci.* **2003**, 116, 637-646.
- (12) Martin, M.; Rehani, K.; Jope, R. S.; Michalek, S. M. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase 3. *Nat. Immunol.* **2005**, 6, 777-784.

- (13) Ding, S.; Wu, T. Y. H.; Brinker, A.; Peters, E. C.; Hur, W.; Gray, N. S.; Schultz, P. G. Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 7632-7637.
- (14) Sato, N.; Meijer, L.; Skaltsounis, L.; Greengard, P.; Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signalling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 55-63.
- (15) Droucheau, E.; Primot, A.; Thomas, V.; Mattei, D.; Knockaert, M.; Radson, C.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Jafarshad, A.; Baratte, B.; Kunick, C.; Parzy, D.; Pearl, L.; Doerig, C.; Meijer, L. *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1697*, 181-196.
- (16) Doerig, C.; Meijer, L. Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 279-290.
- (17) Mussmann, R.; Geese, M.; Harder, F.; Kegel, S.; Andag, U.; Lomow, A.; Onichtchouk, D.; Dohrmann, C.; Austen, M. Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12030-12037.
- (18) Meijer, L.; Flajolet, M.; Greengard, P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 471-480.
- (19) Frame, S.; Zheleva, D. Targeting glycogen synthase kinase-3 in insulin signalling. *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, *10*, 429-444.
- (20) Gray, N.; Detivaud, L.; Doerig, C.; Meijer, L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 859-875.
- (21) Rosania, G. R.; Chang, Y.-T. Targeting hyperproliferative disorders with cyclin dependent kinase inhibitors. *Expert Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1-13.
- (22) Meijer, L.; Leclerc, S.; Leost, M. Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 279-284.
- (23) Pavletich, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 821-828.

- (24) Zhai, S.; Senderowicz, A.; Sausville, E.; Figg, W. D. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. *Ann. Pharmacother.* **2002**, *36*, 905-911.
- (25) Doble, B. W.; Woodgett, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1175-1186.
- (26) Malumbres, M.; Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 222-231.
- (27) Sielecki, T. M.; Boylan, J. F.; Benfield, P. A.; Trainor, G. L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1-18.
- (28) Poon, R. Y. C.; Lew, J.; Hunter, T. Identification of functional domains in the neuronal Cdk5 activator protein. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5703-5708.
- (29) Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261-291.
- (30) Cooper, G. M. *The cell. A molecular approach*; ASM Press: Oxford, 1996; 568-577.
- (31) Kraker, A. J.; Booher, R. N. New targets in cell cycle regulation. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1999**, *34*, 247-256.
- (32) McGarth, C. F.; Pattabiraman, N.; Kellogg, G. E.; Lemcke, T.; Kunick, C.; Sausville, E.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R. Homology model of the CDK1/cyclin B Complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2005**, *22*, 493-502.
- (33) Gussio, R.; Zaharevitz, D. W.; McGarth, C. F.; Pattabiraman, N.; Kellogg, G. E.; Schultz, C.; Link, A.; Kunick, C.; Leost, M.; Meijer, L.; Sausville, E. Structure-based design modifications of the paullone molecular scaffold for cyclin-dependent kinase inhibition. *Anti-Cancer Drug Design* **2000**, *15*, 54-66.
- (34) Liu, J.; Kiperos, E. T. Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 1061-1074.
- (35) Angelo, M.; Plattner, F.; Giese, K. P. Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory. *J. Neurochem.* **2006**, *99*, 353-370.
- (36) Tarricone, C.; Dhavan, R.; Peng, J.; Areces, L.; Tsai, L.; Musacchio, A. Structure and Regulation of the CDK5-p25nck5a Complex. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 657-669.

- (37) Mapelli, M.; Massimiliano, L.; Crovace, C.; Seeliger, M. A.; Tsai, L.; Meijer, L.; Musacchio, A. Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 671-679.
- (38) Lau, L. F.; Ahljianian, M. K. Role of CDK5 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosignals* **2003**, *12*, 209-214.
- (39) Nguyen, M. D.; Julien, J. P. Cyclin-dependent kinase 5 in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosignals* **2003**, *12*, 215-220.
- (40) Smith, P. D.; Crocker, S. J.; Jackson-Lewis, V.; Jordan-Sciutto, K. L.; Hayley, S.; Mount, M. P.; O'Hare, M. J.; Callaghan, S.; Slack, R. S.; Przedborski, S.; Anisman, H.; Park, D. S. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13650-13655.
- (41) Kitani, K.; Oguma, S.; Nishiki, T.; Ohmori, I.; Galons, H.; Matsui, H.; Meijer, L.; Tomizawa, K. A Cdk5 inhibitor enhances the induction of insulin secretion by exendin-4 both in vitro and in vivo. *J. Physiol. Sci.* **2007**, *57*, 235-239.
- (42) Wei, F.; Nagashima, K.; Ohshima, T.; Saheki, Y.; Lu, Y.; Matsushita, M.; Yamada, Y.; Mikoshiba, K.; Seino, Y.; Matsui, H.; Tomizawa, K. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1104-1108.
- (43) Kunick, C.; Lauenroth, K.; Wieking, K.; Xie, X.; Schultz, C.; Gussio, R.; Zaharevitz, D. W.; Leost, M.; Meijer, L.; Weber, A.; Jørgensen, F. S.; Lemcke, T. Evaluation and comparison of 3D-QSAR CoMSIA Models for CDK1, CDK5 and GSK-3 inhibition by paullones. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 22-36.
- (44) Pei, J. J.; Tanaka, T.; Tung, Y.-C.; Braak, E.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I. Disruption, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1997**, *56*, 70-78.
- (45) Leroy, K.; Boutajangout, A.; Authelet, M.; Woodgett, J. R.; Anderton, B. H.; Brion, J.-P. The active form of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2002**, *103*, 91-99.
- (46) Rockenstein, E.; Torrance, M.; Adame, A.; Mante, M.; Bar-on, P.; Rose, J. B.; Crews, L.; Masliah, E. Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's

- Disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 1981-1991.
- (47) Zimmet, P.; Alberti, K. G. M. M.; Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **2001**, 414, 782-787.
- (48) Eldar-Finkelman, H. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol. Med.* **2002**, 8, 126-132.
- (49) Nikoulina, S. E.; Ciaraldi, T. P.; Mudaliar, S.; Mohideen, P.; Carter, L.; Henry, R. R. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes* **2000**, 49, 263-271.
- (50) Ring, D. B.; Johnson, K. W.; Henriksen, E. J.; Nuss, J. M.; Goff, D.; Kinnick, T. R.; Ma, S. T.; Reeder, J. W.; Samuels, I.; Slabiak, T.; Wagman, A. S.; Hammond, M. W.; Harrison, S. D. Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* **2003**, 52, 588-595.
- (51) Jope, R. S.; Yuskaitis, C. J.; Beurel, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* **2007**, 32, 577-595.
- (52) Mussmann, R.; Kunick, C.; Stukenbrock, H.; Geese, M.; Kegel, S.; Burk, U. Azapallones as immunomodulators, their preparation, pharmaceutical compositions, and use for preventing and treating pancreatic autoimmune disorders. *PCT Int. Appl.* **2006**, WO2006117221.
- (53) Larsen, C. M.; Faulenbach, M.; Vaag, A.; Vølund, A.; Ehses, J. A.; Seifert, B.; Mandrup-Poulsen, T.; Donath, M. Y. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 1517-1526.
- (54) Rother, K. I. Diabetes treatment - bridging the divide. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 1499-1501.
- (55) Schultz, C.; Link, A.; Leost, M.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Sausville, E. A.; Meijer, L.; Kunick, C. Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2909-2919.
- (56) Bertrand, J. A.; Thieffine, S.; Vulpetti, A.; Cristiani, C.; Valsasina, B.; Knapp, S.; Kalisz, H. M.; Flocco, M. Structural characterization of the GSK-3 $\beta$  active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors. *J. Mol. Biol.* **2003**, 333, 393-407.

- (57) Kunick, C.; Lauenroth, K.; Leost, M.; Meijer, L.; Lemcke, T. 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 413-416.
- (58) Brun, T.; Franklin, I.; St-Onge, L.; Biason-Lauber, A.; Schoenle, E. J.; Wollheim, C. B.; Gauthier, B. R. The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes  $\beta$ -cell proliferation in rat and human islets. *J. Cell Biol.* **2004**, *167*, 1123-1135.
- (59) Mukai, F.; Ishiguro, K.; Sano, K.; Fujita, S. C. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 1073-1083.
- (60) Hoeflich, K. P.; Luo, J.; Rubie, E. A.; Tsao, M. S.; Jin, O.; Woodgett, J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* **2000**, *406*, 86-90.
- (61) Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T. C.; Pearl, L. H. Crystal structure of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **2001**, *105*, 721-732.
- (62) Fiol, C. J.; Wang, A.; Roeske, R. W.; Roach, P. J. Ordered multisite protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6061-6065.
- (63) Cohen, P.; Alessi, D. R.; Cross, D. A. E. PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett.* **1997**, *410*, 3-10.
- (64) Eldar-Finkelman, H.; Schreyer, S. A.; Shinohara, M. M.; LeBoeuf, R. C.; Krebs, E. G. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* **1999**, *48*, 1662-1666.
- (65) Bhat, R.; Xue, Y.; Berg, S.; Hellberg, S.; Ormö, M.; Nilsson, Y.; Radesäter, A.; Jerning, E.; Markgren, P.; Borgegård, T.; Nylöf, M.; Giménez-Cassina, A.; Hernández, F.; Lucas, J. J.; Díaz-Nido, J.; Avila, J. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45937-45945.
- (66) McManus, E. J.; Sakamoto, K.; Armit, L. J.; Ronaldson, L.; Shpiro, N.; Marquez, R.; Alessi, D. R. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1571-1583.

- (67) Dokken, B. B.; Sloniger, J. A.; Henriksen, E. J. Acute selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances insulin signaling in prediabetic insulin-resistant rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2005**, *288*, E1188-E1194.
- (68) Wagman, A. S.; Johnson, K. W.; Bussiere, D. E. Discovery and development of GSK3 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Pharmaceut. Design* **2004**, *10*, 1105-1137.
- (69) Thong, F. S. L.; Dugani, C. B.; Klip, A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)* **2005**, *20*, 271-284.
- (70) Karlsson, H. K. R.; Zierath, J. R.; Kane, S.; Krook, A.; Lienhard, G. E.; Wallberg-Henriksson, H. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **2005**, *54*, 1692-1697.
- (71) Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 1837-1851.
- (72) Miller, J. R. The Wnts. *Genome Biol.* **2002**, *3*, 3001-3015.
- (73) Frame, S.; Cohen, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, *359*, 1-16.
- (74) Price, M. A. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 399-410.
- (75) Clevers, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in development and disease. *Cell* **2006**, *127*, 469-480.
- (76) Coghlan, M. P.; Culbert, A. A.; Cross, D. A. E.; Corcoran, S. L.; Yates, J. W.; Pearce, N. J.; Rausch, O. L.; Murphy, G. J.; Carter, P. S.; Cox, L. R.; Mills, D.; Brown, M. J.; Haigh, D.; Ward, R. W.; Smith, D. G.; Murray, K. J.; Reith, A. D.; Holder, J. C. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 793-803.
- (77) Cohen, Y.; Chetrit, A.; Sirota, P.; Modan, B. Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med. Oncol.* **1998**, *15*, 32-36.
- (78) Doble, B. W.; Patel, S.; Wood, G. A.; Kockeritz, L. A.; Woodgett, J. R. Functional redundancy of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling

- shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev. Cell* **2007**, *12*, 957-971.
- (79) Rulifson, I. C.; Karnik, S. K.; Heiser, P. W.; ten Berge, D.; Chen, H.; Gu, X.; Taketo, M. M.; Nusse, R.; Hebrok, M.; Kim, S. K. Wnt signaling regulates pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 6247-6252.
- (80) Reya, T.; Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **2005**, *434*, 843-850.
- (81) Teo, R.; Möhrlen, F.; Plickert, G.; Müller, W. A.; Frank, U. An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Dev. Biol.* **2006**, *289*, 91-99.
- (82) Plickert, G.; Jacoby, V.; Frank, U.; Müller, W. A.; Mokady, F. Wnt signaling in hydroid development: Formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning. *Dev. Biol.* **2006**, *298*, 368-378.
- (83) Ingham, P. W.; McMahon, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 3059-3087.
- (84) Huangfu, D.; Anderson, K. W. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* **2006**, *133*, 3-14.
- (85) Tempé, D.; Casas, M.; Karaz, S.; Blanchet-Tournier, M.-F.; Concordet, J.-P. Multisite Protein Kinase A and Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup>. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 4316-4326.
- (86) Takenaka, K.; Kise, Y.; Miki, H. GSK3 $\beta$  positively regulates Hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 501-508.
- (87) Beachy, P. A.; Karhadkar, S. S.; Berman, D. M. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **2004**, *432*, 324-331.
- (88) Ramachandra, G.; Naik, S. L.; Kattige, S. V.; Bhat, B.; Alreja, N. J.; Rupp, K. H. An antiinflammatory cum immunomodulatory piperidinybenzopyranone from *Dysoxylum binectariferum*: isolation, structure, and total synthesis. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2081-2086.
- (89) Senderowicz, A. Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest. New Drugs* **1999**, *17*, 313-320.



- (90) Meijer, L.; Thunnissen, A.-M. W. H.; White, A. W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L.-H.; Walter, J.; Cleverley, K. E.; Salinas, P. C.; Wu, Y.-Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Kim, S.-H.; Pettit, G. R. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 $\beta$  and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.
- (91) Shen, L.; Prouty, C.; Conway, B. R.; Westover, L.; Xu, J. Z.; Look, R. A.; Chen, X.; Beavers, M. P.; Roberts, J.; Murray, W. V.; Demarest, K. T.; Kuo, G.-H. Synthesis and biological evaluation of novel macrocyclic bis-7-azaindolylnmaleimides as potent and highly selective glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1239-1255.
- (92) Zhang, H.-C.; White, K. B.; Ye, H.; McComsey, D. F.; Derian, C. K.; Addo, M. F.; Andrade-Gordon, P.; Eckardt, A. J.; Conway, B. R.; Westover, L.; Xu, J. Z.; Look, R.; Demarest, K. T.; Emanuel, S.; Maryanoff, B. E. Macrocyclic bisindolylnmaleimides as inhibitors of protein kinase C and glycogen synthase kinase-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3049-3053.
- (93) Zhang, H.-C.; Boñaga, L. V. R.; Ye, H.; Derian, C. K.; Damiano, B. P.; Maryanoff, B. E. Novel bis(indolyl)maleimide pyridinophanes that are potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2863-2868.
- (94) Kozikowski, A. P.; Gaisina, I. N.; Petukhov, P. A.; Sridhar, J.; King, L. T.; Blond, S. Y.; Duka, T.; Rusnak, M.; Sidhu, A. Highly potent and specific GSK-3 $\beta$  inhibitors that block tau phosphorylation and decrease  $\alpha$ -synuclein protein expression in a cellular model of Parkinson's disease. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 256-266.
- (95) Kozikowski, A. P.; Gaisina, I. N.; Yuan, H.; Petukhov, P. A.; Bond, S. Y.; Fedolak, A.; Caldarone, B.; McGonigle, P. Structure-based design leads to the identification of lithium mimetics that block mania-like effects in rodents. Possible new GSK-3 $\beta$  therapies for bipolar disorders. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8328-8332.
- (96) Martinez, A.; Alonso, M.; Castro, A.; Pérez, C.; Moreno, J. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) inhibitors: Thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1292-1299.

- (97) Martinez, A.; Alonso, M.; Castro, A.; Dorronsoro, I.; Gelpí, J. L.; Luque, F. J.; Pérez, C.; Moreno, J. SAR and 3D-QSAR studies on thiadiazolidinone derivatives: exploration of structural requirements for glycogen synthase kinase 3 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7103-7112.
- (98) Ferandin, Y.; Bettayeb, K.; Kritsanida, M.; Lozach, O.; Polychronopoulos, P.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.-L.; Meijer, L. 3'-Substituted 7-Halogenindirubins, a new class of cell death inducing agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4638-4649.
- (99) Leclerc, S.; Garnier, M.; Hoessel, R.; Marko, D.; Bibb, J. A.; Snyder, G. L.; Greengard, P.; Biernat, J.; Wu, Y.-Z.; Mandelkow, E.-M.; Eisenbrand, G.; Meijer, L. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 251-260.
- (100) Liao, J. J.-L. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 409-424.
- (101) Polychronopoulos, P.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.-L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Tarricone, A.; Musacchio, A.; Roe, S. M.; Pearl, L.; Leost, M.; Greengard, P.; Meijer, L. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 935-946.
- (102) Tseng, A.-S.; Engel, F. B.; Keating, M. T. The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 957-963.
- (103) Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Leost, M.; Senderowicz, A.; Lahusen, T.; Kunick, C.; Meijer, L.; Sausville, E. A. Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2566-2569.
- (104) Leost, M.; Schultz, C.; Link, A.; Wu, Y.-Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Bibb, J. A.; Snyder, G. L.; Greengard, P.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Senderowicz, A. M.; Sausville, E. A.; Kunick, C.; Meijer, L. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5983-5994.
- (105) Tatebayashi, Y.; Haque, N.; Tung, Y.-C.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the regulation of organelle transport. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1653-1663.

- (106) Kunick, C.; Zeng, Z.; Gussio, R.; Zaharevitz, D.; Leost, M.; Totzke, F.; Schächtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Meijer, L.; Lemcke, T. Structure-aided optimization of kinase inhibitors derived from alsterpaullone. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 541-549.
- (107) Greenwald, R. B.; Zhao, H.; Xia, J.; Wu, D.; Nervi, S.; Stinson, S. F.; Majerova, E.; Bramhall, C.; Zaharevitz, D. W. Poly(ethylene glycol) prodrugs of the CDK inhibitor, alsterpaullone (NSC 705701): synthesis and pharmacokinetic studies. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1076-1083.
- (108) Xie, X.; Lemcke, T.; Gussio, R.; Zaharevitz, D. W.; Leost, M.; Meijer, L.; Kunick, C. Epoxide-containing side chains enhance antiproliferative activity of paullones. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 655-661.
- (109) Takadera, T.; Ohyashiki, T. Caspase-dependent apoptosis induced by calcineurin inhibitors was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in cultured rat cortical cells. *Brain Res.* **2007**, *1133*, 20-26.
- (110) Takadera, T.; Yoshikawa, R.; Ohyashiki, T. Thapsigargin-induced apoptosis was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **2006**, *408*, 124-128.
- (111) Peat, A. J.; Garrido, D.; Boucheron, J. A.; Schweiker, S. L.; Dickerson, S. H.; Wilson, J. S.; Wang, T. Y.; Thomson, S. A. Novel GSK-3 inhibitors with improved cellular activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2127-2130.
- (112) Tavares, F. X.; Boucheron, J. A.; Dickerson, S. H.; Griffin, R. J.; Preugschat, F.; Thomson, S. A.; Wang, T. Y.; Zhou, H.-Q. *N*-Phenyl-4-pyrazolo[1,5-*b*]pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4716-4730.
- (113) Olesen, P. H.; Sørensen, A. R.; Ursø, B.; Kurtzhals, P.; Bowler, A. N.; Ehrbar, U.; Hansen, B. F. Synthesis and in vitro characterization of 1-(4-aminofurazan-3-yl)-5-dialkylaminomethyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid derivatives. A new class of selective GSK-3 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3333-3341.
- (114) Pande, V.; Ramos, M. J. Structural basis for the GSK-3 $\beta$  binding affinity and selectivity against CDK-2 of 1-(4-aminofurazan-3-yl)-5-dialkylaminomethyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5129-5135.

- (115) Shin, D.; Lee, S.-C.; Heo, Y.-S.; Lee, W.-Y.; Cho, Y.-S.; Kim, Y. E.; Hyun, Y.-L.; Cho, J. M.; Lee, Y. S.; Ro, S. Design and synthesis of 7-hydroxy-1*H*-benzoimidazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5686-5689.
- (116) Stuart, E. T.; Kioussi, C.; Gruss, P. Mammalian Pax genes. *Annu. Rev. Genet.* **1993**, *27*, 219-236.
- (117) Noll, M. Evolution and role of Pax genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1993**, *3*, 595-605.
- (118) Xu, H. E.; Rould, M. A.; Xu, W.; Epstein, J. A.; Maas, R. L.; Pabo, C. O. Crystal structure of the human Pax6 paired domain–DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1263-1275.
- (119) Chi, N.; Epstein, J. A. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.* **2002**, *18*, 41-47.
- (120) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A visualisation system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605-1612.
- (121) Demeterco, C.; Levine, F. Gene therapy for diabetes. *Front. Biosci.* **2001**, *6*, D175-D191.
- (122) Sartipy, P.; Björquist, P.; Strehl, R.; Hyllner, J. The application of human embryonic stem cell technologies to drug discovery. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 688-699.
- (123) Blyszczuk, P.; Czyz, J.; Kania, G.; Wagner, M.; Roll, U.; St-Onge, L.; Wobus, A. M. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 998-1003.
- (124) Assady, S.; Maor, G.; Amit, M.; Itskovitz-Eldor, J.; Skorecki, K. L.; Tzukerman, M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* **2001**, *50*, 1691-1697.
- (125) Roche, E.; Jones, J.; Arribas, M. I.; Leon-Quinto, T.; Soria, B. Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6466-6474.

- (126) Sosa-Pineda, B.; Chowdhury, K.; Torres, M.; Oliver, G.; Gruss, P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing  $\beta$ -cells in the mammalian pancreas. *Nature* **1997**, *386*, 399-402.
- (127) Gittes, G. K.; Rutter, W. J. Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 1128-1132.
- (128) Huang, H.-P.; Tsai, M.-J. Transcription factors involved in pancreatic islet development. *J. Biomed. Sci.* **2000**, *7*, 27-34.
- (129) Tang, D.-Q.; Cao, L.-Z.; Chou, W.; Shun, L.; Farag, C.; Atkinson, M. A.; Li, S.-W.; Chang, L.-J.; Yang, L.-J. Role of Pax4 in Pdx1-VP16-mediated liver-to-endocrine pancreas transdifferentiation. *Lab. Invest.* **2006**, *86*, 829-841.
- (130) Brun, T.; Duhamel, D. L.; Hu He, K. H.; Wollheim, C. B.; Gauthier, B. R. The transcription factor PAX4 acts as a survival gene in INS-1E insulinoma cells. *Oncogene* **2007**, *26*, 4261-4271.
- (131) Merglen, A.; Theander, S.; Rubi, B.; Chaffard, G.; Wollheim, C. B.; Maechler, P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studies during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* **2004**, *145*, 667-678.
- (132) Lu, J.; Li, G.; Lan, M. S.; Zhang, S.; Fan, W.; Wang, H.; Lu, D. Pax4 paired domain mediates direct protein transduction into mammalian cells. *Endocrinology* **2007**, *148*, 5558-5565.
- (133) ter Haar, E.; Coll, J. T.; Austen, D. A.; Hsiao, H. M.; Swenson, L.; Jain, J. Structure of GSK3 $\beta$  reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 593-596.
- (134) ter Haar, E. The crystal structures of glycogen synthase kinase 3. In: *"Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and its inhibitors"*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken (USA), 2006; 61-82.
- (135) Pierce, A. C.; ter Haar, E.; Binch, H. M.; Kay, D. P.; Patel, S. R.; Li, P. CH $\cdots$ O and CH $\cdots$ N hydrogen bonds in ligand design: A novel quinazolin-4-ylthiazol-2-ylamine protein kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1278-1281.
- (136) Pierce, A. C.; Sandretto, K. L.; Bemis, G. W. Kinase inhibitors and the case for CH $\cdots$ O hydrogen bonds in protein-ligand binding. *Proteins* **2002**, *49*, 567-576.
- (137) Clark, M.; Cramer, R. D., I.; Van Obdenbosch, N. The Tripos Forcefield. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.

- (138) Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. *Molecular Modelling. Wirkstoffdesign*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1996; 281-296.
- (139) Jensen, F. Force field methods. *Introduction to computational chemistry*; 1 ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 1998; pp 6-52.
- (140) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470-489.
- (141) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. Multiple automatic base selection: protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 369-384.
- (142) SYBYL 7.0, Tripos Inc., St. Louis, Missouri, USA.
- (143) Stewart, J. J. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1990**, *4*, 1-105.
- (144) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. The particle concept: placing discrete water molecules during protein-ligand docking prediction. *Proteins* **1999**, *34*, 17-28.
- (145) Liljefors, T. Solvation Models. *Advanced Structural Chemistry and Molecular Modelling*; Danish University of Pharmaceutical Sciences, Copenhagen, Denmark, 2005.
- (146) Boelsterli, U. A.; Ho, H. K.; Zhou, S.; Yeow Leow, K. Bioactivation and hepatotoxicity of nitroaromatic drugs. *Curr. Drug Metab.* **2006**, *7*, 715-727.
- (147) Gohlke, H.; Klebe, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2644-2676.
- (148) Pies, T.; Schaper, K.-J.; Leost, M.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Meijer, L.; Kunick, C. CDK1-Inhibitory activity of paullones depends on electronic properties of 9-substituents. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2004**, *337*, 486-492.
- (149) Lescot, E.; Bureau, R.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Rochais, C.; Lisowski, V.; Lancelot, J.-C.; Rault, S. 3D-QSAR and docking studies of selective GSK-3 $\beta$  inhibitors. Comparison with a thieno[2,3-*b*]pyrrolizinone derivative, a new potential lead for GSK-3 $\beta$  ligands. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 708-715.
- (150) Lauenroth, K. Paullonderivate mit veränderter heterocyclischer Grundstruktur als Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen. *Dissertation Universität Hamburg* **2001**.

- (151) Sucharda, E. Über eine neue Darstellungsmethode der Chinolinsäure und einiger Derivate derselben. *Chem. Ber.* **1925**, 58, 1727-1729.
- (152) Oakes, V.; Pascoe, R.; Rydon, H. N. Polyazanaphthalenes. Part III. Some derivatives of 1:3:5- and 1:3:8-triazanaphthalene. *J. Chem. Soc.* **1956**, 1045-1054.
- (153) de Mesquita, M. E.; Júnior, S. A.; Oliveira, F. C.; Freire, R. O.; Júnior, N. B. C.; de Sá, G. F. Synthesis, spectroscopic studies and structure prediction of the new Tb(3-NH<sub>2</sub>PIC)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O complex. *Inorg. Chem. Commun.* **2002**, 5, 292-295.
- (154) Chen, Q.; Deady, L. W. Synthesis of some benzo[b][1,8] and [1,5]naphthyridines. *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, 29, 1197-1201.
- (155) Chen, Q.; Deady, L. W. Synthesis of some benzo[b][1,8] and [1,5]naphthyridines. *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, 29, 1197-1201.
- (156) Taylor, E. C.; Knopf, R. J.; Cogliano, J. A.; Barton, J. W.; Pleiderer, W. A facile pyrimidine ring cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 6058-6064.
- (157) Min, R. S.; Aksenov, V. S. Homolytic ethoxycarbonylation of aminopyridines. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1988**, 8, 1075-1077.
- (158) Cragoe, E. J. J. Diuretic (aminopyridylcarbonyl)guanidines. *Ger. Offen.* **1970**, DE1963317.
- (159) Chen, J.-I.; Steglich, W. Synthesis of some benzofuronaphthyridines and benzofuronaphthyridine derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, 30, 909-912.
- (160) Kunick, C. Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxycarbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, 324, 579-581.
- (161) Kunick, C. Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-(5*H*)-onen und 6,11-Dihydro-thieno-[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on. *Arch. Pharm.* **1992**, 325, 297-299.
- (162) Fitzpatrick, J. T.; Hiser, R. D. Noncatalytic Fischer indole synthesis. *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 1703-1704.
- (163) Vysotskii, Y. B.; Przheval'skii, N. M.; Zemskii, B. P.; Grandberg, I. I.; Kostromina, L. Y. Mechanism of the Fischer indole synthesis. Quantum-chemical interpretation of the rearrangement of substituted cyclohexanone arylhydrazones to tetrahydrocarbazoles. *Chem. Het. Comp. (Engl. Trans.)* **1986**, 713-722.

- (164) Kremsner, J. M.; Kappe, C. O. Microwave-assisted organic synthesis in near-critical water at 300°C - a proof-of-concept study. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3672-3679.
- (165) Strauss, C. R.; Trainor, R. W. Development in microwave-assisted organic chemistry. *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 1665-1692.
- (166) Strauss, C. R. A combinatorial approach to the development of environmentally benign organic chemical preparations. *Aust. J. Chem.* **1999**, *53*, 83-96.
- (167) Raner, K. D.; Strauss, C. R.; Trainor, R. W.; Thorn, J. S. A new microwave reactor for batchwise organic synthesis. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2456-2460.
- (168) Bröll, D.; Kaul, C.; Krämer, A.; Krammer, P.; Richter, T.; Jung, M.; Vogel, H.; Zehner, P. Chemie in überkritischem Wasser. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3180-3196.
- (169) Kappe, C. O. Kontrolliertes Erhitzen mit Mikrowellen in der modernen organischen Synthese. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6408-6443.
- (170) Fox, H. H. Synthetic tuberculostats. II. Amino- and hydroxy-pyridine carboxylic acid derivatives. *J. Org. Chem.* **1951**, *17*, 547-554.
- (171) Kadieva, M. G.; Oganessian, É. T. Methods for the synthesis of benzofuran derivatives (Review). *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y., NY, U. S.)* **1997**, *33*, 1245-1258.
- (172) Bachelet, J.-P.; Caubere, P. Aryne and S<sub>N</sub>Ar reactions of polyhalogenbenzenes. 6. Synthesis of benzofurans. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 234-238.
- (173) Willis, M. C.; Taylor, D.; Gillmore, A. T. Palladium-catalyzed intramolecular O-arylation of enolates: application to benzo[*b*]furan synthesis. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4755-4757.
- (174) Link, A. Antitumoraktive Pyrido[3,2-*d*]-1-benzazepine. *Dissertation Universität Hamburg* **1996**.
- (175) Petrassi, H. M.; Sharpless, K. B.; Kelly, J. W. The copper-mediated cross-coupling of phenylboronic acids and *N*-hydroxyphthalimide at room temperature: synthesis of aryloxyamines. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 139-142.
- (176) Baldoli, C.; Del Buttero, P.; Licandro, E.; Maiorana, S. Nucleophilic aromatic substitution on tricarbonyl(halogenoarene)chromium complexes: a new synthesis of O-arylhydroxylamines. *Synthesis* **1988**, 344-345.



- (177) Endo, Y.; Shudo, K.; Okamoto, T. An acid catalyzed rearrangement of O-aryl-N-benzoylhydroxylamines; synthesis of catechols from phenols. *Synthesis* **1980**, 461-463.
- (178) Collman, J. P.; Zhong, M. An efficient diamine-copper complex-catalyzed coupling of arylboronic acids with imidazoles. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1233-1236.
- (179) Lam, P. Y. S.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Averill, K. M.; Chan, D. M. T.; Combs, A. Copper promoted aryl/saturated heterocyclic C-N bond cross-coupling with arylboronic acid and arylstannane. *Synlett* **2000**, 674-676.
- (180) Castellino, A. J.; Rapoport, H. Synthesis of benzofurans from oxygenated phenoxyamines. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4399-4404.
- (181) Sheradsky, T. Application of the Fischer-indole-synthesis to the preparation of benzofurans. *Tetrahedron Lett.* **1966**, 43, 5225-5227.
- (182) Kaminsky, D.; Jr., S., John; Meltzer, R. I. Fischer indole like synthesis. An approach to the preparation of benzofurans and benzothiophenes. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 859-861.
- (183) Sheradsky, T.; Nov, E. Studies on the preparation of N-alkyl-O-phenylhydroxylamines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1980**, 12, 2781-2786.
- (184) Mooradian, A.; Dupont, P. E. The rearrangement of O-aryl oximes. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 2867-2870.
- (185) Miyata, O.; Takeda, N.; Morikami, Y.; Naito, T. Efficient [3,3]-sigmatropic rearrangement accelerated by a trifluoroacetyl group: synthesis of benzofurans under mild conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 254-256.
- (186) Miyata, O.; Takeda, N.; Naito, T. Highly effective synthetic methods for substituted 2-arylbenzofurans using [3,3]-sigmatropic rearrangement: short syntheses of stemofuran A and eupomatenoid 6. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1761-1763.
- (187) Forbus Jr., T. R.; Taylor, S. L.; Martin, J. C. Reactions of the readily accesible electrophile, trifluoroacetyl triflate: a very reactive agent for trifluoroacetylation at oxygen, nitrogen, carbon, or halogen centers. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4156-4159.
- (188) Ishii, H. Nucleophilic displacement of the methoxy group in abnormal Fischer indolization of 2-methoxyphenylhydrazones. *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 275-283.

- (189) Ishii, H.; Murakami, Y.; Ishikawa, T. Abnormal Fischer indolization and its related compounds. XXII. Fischer indolization of ethyl pyruvate 2-(2-chloro- and 2,6-dichlorophenyl)methylhydrazones. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 597-604.
- (190) Schultz, C. Antitumoraktive [d]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. *Dissertation Universität Hamburg* **1999**.
- (191) Castro, J. L.; Baker, R.; Guiblin, A. R.; Hobbs, S. C.; Jenkins, M. R.; Russel, M. G. N.; Beer, M. S.; Stanton, J. A.; Scholey, K.; Hargreaves, R. J.; Graham, M. I.; Matassa, V. G. Synthesis and biological activity of 3-[2-(dimethylamino)ethyl]-5-[(1,1-dioxo-5-methyl-1,2,5-thiadiazolidin-2-yl)methyl]-1*H*-indole and analogues: agonists for the 5-HT<sub>1D</sub> receptor. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2023-3032.
- (192) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C.; Badertscher, M. *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen*; 4. Aufl.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2001.
- (193) Arcadi, A.; Bianchi, G.; Marinelli, F. Gold(III)-catalyzed annulation of 2-alkynylanilines: a mild and efficient synthesis of indoles and 3-haloindoles. *Synthesis* **2004**, 610-618.
- (194) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 7. Aufl.; Thieme: Stuttgart, 2005.
- (195) Croasman, W. R.; Carlson, R. M. M. *Two-dimensional NMR spectroscopy*; 2. Aufl.; VCH Publishers: New York, 1994.
- (196) Fink, D. M. Cesium carbonate promoted N-alkylations of indoles. *Synlett* **2004**, *13*, 2394-2396.
- (197) Lehmann, F. Cesium carbonate (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). *Synlett* **2004**, *13*, 2447-2448.
- (198) Flessner, T.; Doye, S. Cesium carbonate: a powerful inorganic base in organic synthesis. *J. Prakt. Chem.* **1999**, *341*, 186-190.
- (199) Zakurdaev, E. P.; Balenkova, E. S.; Nenajdenko, V. G. Synthesis of substituted tryptamines and their homologs: a new aspect in the Fischer reaction. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2005**, *54*, 1219-1228.
- (200) Maligres, P. E.; Waters, M. S.; Fleitz, F.; Askin, D. A highly catalytic robust palladium catalyzed cyanation of aryl bromides. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8193-8195.

- (201) Torraca, K. E.; Huang, X.; Parrish, C. A.; Buchwald, S. E. An efficient intermolecular palladium-catalyzed synthesis of aryl ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10770-10771.
- (202) Vorogushin, A. V.; Huang, X.; Buchwald, S. E. Use of tunable ligands allows for intermolecular Pd-catalyzed C-O bond formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8146-8149.
- (203) Humphries, P. S.; Bailey, S.; Do, Q.-Q. T.; Kellum, J. H.; McClellan, G. A.; Wilhite, D. M. Intermolecular palladium-catalyzed coupling of 2-halopyridines and alcohols for the preparation of pyridine ether PPAR agonists. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5333-5336.
- (204) Zhang, H.; Ma, D.; Cao, W. *N,N*-Dimethylglycine-promoted Ullmann-type coupling reactions of aryl iodides with aliphatic alcohols. *Synlett* **2007**, *2*, 243-246.
- (205) Wolter, M.; Nordmann, G.; Job, G. E.; Buchwald, S. L. Copper-catalyzed coupling of aryl iodides with aliphatic alcohols. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 973-976.
- (206) Zhang, H.; Cai, Q.; Ma, D. Amino acid promoted Cu-catalyzed C-N bond formation between aryl halides and amines or N-containing heterocycles. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5164-5173.
- (207) Yeh, V. S. C.; Wiedemann, P. E. Practical Cu-catalyzed amination of functionalized heteroaryl halides. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6011-6016.
- (208) Kunick, C. Fused [1]benzazepines. Pentacyclic [1]benzazepines by reaction of 1*H*-[1]benzazepine-2,5(3*H*,4*H*)-dione with aldehydes. *Heterocycles* **1995**, *41*, 2299-2306.
- (209) Mosterd, A.; Matser, H. J.; Bos, H. J. T. Photoaddition of non-cisoid 1,2-diketones and phenylglyoxal to alkylthioacetylenes; preparation of 3-alkylthiofurans. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *48*, 4179-4180.
- (210) Mao, J.; Maye, P.; Kogerman, P.; Tejedor, F. J.; Toftgard, R.; Xie, W.; Wu, G.; Wu, D. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35156-35161.
- (211) Miyata, Y.; Nishida, E. Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *266*, 291-295.
- (212) Pies, T. 9-Substituted Paullones: synthesis and analysis of structure-activity relationships. *Dissertation Universität Hamburg* **2003**.

- (213) Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J. P. J.; Blow, J. J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J.-G.; Moulinoux, J.-P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 527-536.
- (214) Primot, A.; Baratte, B.; Gompel, M.; Borgne, A.; Liabeuf, S.; Romette, J. L.; Constantini, F.; Meijer, L. Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilised axin. *Protein Expr. Purif.* **2000**, *20*, 394-404.
- (215) Kruggel, S.; Lemcke, T. Docking of paullones into the active site of CDK5 using FLEXX and FLEXS, evaluation of a corresponding CoMSIA analysis. *Wahlpflichtpraktikumsreport, Hamburg* **2005**.
- (216) Joucla, L.; Popowycz, F.; Lozach, O.; Meijer, L.; Joseph, B. Access to paullone analogues by intramolecular Heck reaction. *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 753-763.
- (217) Vida 2.1.2 *OpenEye Scientific Software Inc.*, Santa Fe, NM 87507, USA.
- (218) Srinivasan, S.; Ohsugi, M.; Liu, Z.; Fatrai, S.; Bernal-Mizrachi, E.; Permutt, M. A. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in mouse insulinoma cells. *Diabetes* **2005**, *54*, 968-975.
- (219) Donath, M. Y.; Ehse, J. A.; Maedler, K.; Schumann, D. M.; Ellingsgaard, H.; Eppler, E.; Reinecke, M. Mechanisms of  $\beta$ -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* **2005**, *54*, Suppl. 2, 108-113.
- (220) Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of laboratory chemicals*; 5. Aufl.; MPG Books: Bodmin, Cornwall, Great Britain, 2003.
- (221) Möllenbeck, J. M. Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen: Synthese und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. *Dissertation Universität Hamburg* **2005**.
- (222) Balasubramaniyan, V.; Argade, N. Reactions of cyclic anhydrides: Part XIII - Facile synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyridazino[6,1-b]quinazoline-2,10-diones. *Indian J. Chem.* **1988**, *27B*, 906-908.
- (223) Morgan Conn, M.; Deslongchamps, G.; de Mendoza, J.; Rebek Jr., J. Convergent Functional Groups. 13. High-affinity complexation of adenosine derivatives within induced binding pockets. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3548-3557.

- (224) MOE (Molecular Operating Environment); Chemical Computing Group Inc.: Montreal, Quebec, Canada H3B 3X3, 2006.08.
- (225) OMEGA 2.2.1, Openeye Software Inc., Santa Fe, NM 87508, USA.
- (226) FRED 2.2.3, Openeye Software Inc., Santa Fe, NM 87508, USA.
- (227) Reinhardt, J.; Ferandin, Y.; Meijer, L. Purification of native, active casein kinase 1 (CK1) by affinity chromatography on immobilised axin fragment. *Protein Expr. Purif.* **2007**, *54*, 101-109.

## Danksagung

Für die Durchführung der biologischen Testungen möchte ich mich bei Herrn Y. Ferandin und Herrn Professor Dr. L. Meijer von der Station Biologique de Roscoff (CNRS, Bretagne, Frankreich) sowie bei Frau Dr. S. Kegel, Frau Dr. U. Burk und den Herren Dres. M. Geese, A. Lomow, C. Dohrmann, M. Austen und R. Mußmann der DeveloGen AG, Göttingen bedanken.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Dr. T. Lemcke von der Universität Hamburg für die Ermöglichung des Forschungsaufenthalts und die freundliche Unterstützung bei den Docking-Experimenten aussprechen. In diesem Zusammenhang gilt ihm und Herrn Dr. F. S. Jørgensen mein weiterer Dank für die Ermöglichung der Teilnahme an dem Workshop „Advanced Structural Chemistry and Molecular Modelling“ an der Danish University of Pharmaceutical Sciences, Kopenhagen.

Dankbar bin ich Herrn Dr. Lutz Preu für die interessanten fachlichen Diskussionen und die technische Unterstützung bei der Bearbeitung der Korrelationsspektren.

Ich danke den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die Durchführung der Elementaranalysen, die Anfertigung der FT-IR-Spektren und die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Für die Aufnahme der FT-NMR-Spektren danke ich Frau P. Holba-Schulz, Frau B. Brinkmann und Herrn Professor Dr. L. Ernst. Mein Dank gilt Frau D. Döring, Herrn Dr. U. Papke und Herrn Dr. T. Beuerle für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen. Für die Analyse der Röntgenkristallstrukturen danke ich Herrn Professor Dr. P. G. Jones.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig bedanken. Insbesondere gilt mein Dank den Mitgliedern des Arbeitskreises Frau A.-M. Egert-Schmidt, Frau W. Brandt, Frau C. Reichwald, Frau A. Becker, Frau S. Lütge, Frau N. Tolle und den ehemaligen Mitgliedern Frau Dr. U. Dunkel, Frau Dr. B. Berger, Frau Dr. J. Röver und Frau Dr. S. Kohfeld.

Für die freundliche Aufnahme am Institut danke ich den ehemaligen Mitarbeitern Herrn Dr. C. Enge, Herrn Dr. J. Schneider, Herrn Dr. M. Noreiks, Herrn Dr. J. Ohnesorge, Herrn Dr. M. Bode und Herrn Dr. B. Gabriel.

Ich danke Frau S. Schröder, Frau I. Winde, Herrn Dr. J. Grünefeld, Herrn Professor Dr. Wätzig, Herrn Dr. U. Schepers, Herrn J. Dreher und Herrn Dr. M. Graf für das kollegiale Verhältnis bei der Durchführung des Praktikums „Allgemeine und analytische Chemie der anorganischen Arzneistoffe, Hilfsstoffe und Schadstoffe“.

Frau A.-M. Egert und Herrn J. Dreher gilt mein Dank für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen. Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn J. Dreher für die Durchführung der Docking-Experimente mit FRED.

Für das erfolgreiche Gelingen der gemeinsamen Tagungsreisen danke ich Frau I. Winde, Frau S. Kühle und Frau A. Plock vom Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig.

Für die vielen überaus interessanten Diskussionen und Anregungen gilt mein besonderer Dank Herrn P. Hasemann und Herrn Dr. C. Prühs, dem ich für den steten Gedankenaustausch bezüglich möglicher Synthesen und deren Durchführung danke.

## Lebenslauf

Name: Hendrik Stukenbrock

Geburtsdatum: 21. Juni 1978

Geburtsort: Hameln

Staatsangehörigkeit: deutsch

1984 – 1988 Grundschule Bisperode

1988 – 1990 Orientierungsstufe Salzhemmendorf

1990 - 1997 Albert Einstein-Gymnasium Hameln

August 1997 – August 1998 Zivildienst im Rettungsdienst des

Deutschen Roten Kreuzes, Hameln

Oktober 1998 – März 1999

Chemiestudium an der Westfälischen-  
Wilhelms Universität, Münster

April 1999 – Mai 2003

Pharmaziestudium an der Technischen  
Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig

Juni 2003 – Dezember 2003

Pharmaziepraktikum, School of Pharmacy,  
University of Otago, Dunedin, Neuseeland

Januar 2004 – Juni 2004

Pharmaziepraktikum, Altstadt-Apotheke, Göttingen

19.07.2004

Approbation als Apotheker

seit September 2004

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Pharmazeutische Chemie der Technischen  
Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig